

M 2014



Expressão proteica diferencial das enzimas de destoxificação Glutathione Transferases em *Mytilus galloprovincialis* após exposição a microcistinas

CATARINA JOÃO SOARES CAETANO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM

TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

Catarina João Soares Caetano

**Expressão proteica diferencial das enzimas de destoxificação
Glutathione Transferases em *Mytilus galloprovincialis* após
exposição a microcistinas**

Dissertação de Candidatura ao grau de
Mestre em Toxicologia e Contaminação
Ambientais submetida ao Instituto de
Ciências Biomédicas de Abel Salazar da
Universidade do Porto

Orientador – Doutor José Carlos Martins

Categoria – Investigador Pós-Doutorado

Afiliação – Centro Interdisciplinar de
Investigação Marinha e Ambiental, CIIMAR

Co-Orientador – Doutor Alexandre Campos

Categoria – Investigador Auxiliar

Afiliação – Centro Interdisciplinar de
Investigação Marinha e Ambiental, CIIMAR

Agradecimentos

Para a realização desta tese contei com o apoio de muitas pessoas, sem as quais não teria sido possível. É com profundo reconhecimento que agradeço:

Em primeiro lugar, por toda ajuda, inestimável disponibilidade, conhecimento partilhado e pela boa disposição sempre presente, ao meu orientador, Doutor José Carlos Martins. E também ao meu co-orientador, Doutor Alexandre Campos, por todo auxílio.

A todos os membros do LEGE (Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução) pelo seu apoio, conselhos e bom ambiente de trabalho criado.

Ao Professor Doutor Vítor Vasconcelos por me aceitar no laboratório e permitir a realização desta minha tese.

À Joana Azevedo pela simpatia e pela preciosa ajuda com análise da toxina por HPLC.

À Mariana Carneiro um enorme obrigada por tudo, pela impagável ajuda e pela inesgotável paciência para com as minhas dúvidas intermináveis.

À Ana de Matos, Catarina Santos, Tiago Afonso, Susana Cruz e Tiago Azevedo pelas palavras inspiradoras, colaboração e animação.

À Rita Mendes por me ouvir quando mais precisava, pela amizade e por me receber em sua casa quando precisei.

À Joana Machado pelo companheirismo nos bons e maus momentos no decorrer destes últimos 2 anos e pela enorme ajuda sempre que foi preciso.

Aos meus “mais que tudo” Cátia Ferreira, Gabriela Moreira, Catarina Oliveira e Tiago Monteiro por me animarem, por me darem força para continuar e por acreditarem em mim.

Por fim, aos meus pais e irmão, a quem dedico esta tese, pelo incentivo e apoio prestado durante todo o meu percurso académico e pelo carinho e ensinamentos dispensados ao longo da vida.

Resumo

Os organismos aquáticos, nomeadamente os bivalves, estão sujeitos ao contacto mais direto e frequente com as microcistinas (MCs). Uma maior eficiência do processo de destoxificação pode influenciar a capacidade de resistência destes organismos a estas cianotoxinas. A capacidade de biotransformação e excreção de MCs tem sido demonstrada em vários bivalves, incluindo *Mytilus galloprovincialis*. Apesar de conhecido o envolvimento do sistema de enzimas de destoxificação GST na resposta molecular a MCs nestes moluscos, pouco se sabe ainda sobre o papel individual de cada uma das isoformas das várias classes nessa resposta.

Neste trabalho foram estudadas as alterações da expressão e a atividade das GST's citosólicas nas brânquias e hepatopâncreas do mexilhão *M. galloprovincialis* induzidas pela exposição a MC-LR purificada e a uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa* (LEGE 91094) durante 24 horas. As frações citosólicas de ambos os órgãos sujeitas aos vários tratamentos foram purificadas recorrendo à cromatografia de afinidade em coluna GSH-agarose e posteriormente analisadas por eletroforese bidimensional (2DE) em tiras IPG de 7 cm (pH 5-8). Os pontos de interesse nos géis 2DE foram excisados e analisados por MALDI-TOF-MS/MS.

Foram obtidos géis 2DE de referência para ambos os órgãos, sendo detetados 9 pontos nas brânquias e 10 pontos no hepatopâncreas, usando como corante Azul de Coomassie. Dos 19 pontos detetados apenas uma proteína foi identificada com confiança estatística. Esta proteína foi identificada nas brânquias como uma subunidade GST. Nas brânquias, a alteração quantitativa da expressão de proteínas foi detetada em 5 pontos no grupo de bivalves expostos à cultura de *M. aeruginosa*. Neste órgão foram detetadas as mesmas 2 diferenças qualitativas entre os grupos de exposição e o grupo controlo para a exposição a MC-LR e cultura de *M. aeruginosa*. No hepatopâncreas, a alteração quantitativa da expressão de proteínas foi detetada em 4 pontos no grupo de bivalves expostos a MC-LR pura e em 1 ponto no grupo de bivalves expostos a *M. aeruginosa*. As alterações quantitativas e qualitativas da expressão de proteínas suportam os dados obtidos para a atividade das GST's citosólicas em ambos os órgãos.

Os resultados obtidos contribuem para o aumento do conhecimento relativo aos mecanismos de destoxificação das MCs, nomeadamente ao nível das várias isoformas GST.

Abstract

Aquatic organisms, particularly bivalves, are subjected to a more direct and frequent contact with microcystins (MCs). A higher efficiency of the detoxification process can influence the tolerance of these organisms to these cyanotoxins. The ability of biotransformation and excretion of MCs has been demonstrated in several bivalves, including *Mytilus galloprovincialis*. Although it is known the involvement of the GST detoxification enzyme system in the molecular response to MCs in these molluscs, little is known about the individual role of each isoform of the several classes in this response.

In this work, changes in expression and activity of cytosolic GST's in the gills and gut of the mussel *M. galloprovincialis* induced by purified MC-LR and a toxic strain of *M. aeruginosa* (LEGE 91094) for 24 hours were studied. The cytosolic fractions of both organs subjected to different treatments were purified using affinity chromatography on GSH-agarose column and subsequently analyzed by two-dimensional electrophoresis (2DE) in 7 cm IPG strips (pH 5-8). The spots of interest in the 2DE gels were excised and analyzed by MALDI-TOF-MS/MS.

Reference 2DE gels were obtained for both organs, being resolved 9 spots in gills and 10 spots in gut, using Coomassie Blue staining. Of the 19 detected spots, only one was identified with statistical confidence. This protein was identified in the gills as a GST subunit. Altered protein expression in gills was quantitatively detected in 5 spots for the group of bivalves exposed to the *M. aeruginosa* strain. In this organ, 2 qualitative differences were detected between the two exposure groups and the control for both exposures. Altered protein expression in gut was quantitatively detected in 4 spots for the group of bivalves exposed to pure MC-LR and 1 spot for the group of bivalves exposed to *M. aeruginosa*. Quantitative and qualitative changes in protein expression support the data obtained for the activity of cytosolic GST's in both organs.

The obtained results contribute to the increase of knowledge concerning the mechanisms of detoxification of MCs, namely in what it respects to the several GST isoforms.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice	iv
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
1. Introdução	1
1.1 Cianobactérias.....	1
1.2 Microcistinas	1
1.2.1 Estrutura e mecanismo de ação	2
1.2.2 Metabolização e destoxificação de MCs.....	4
1.3 Glutathione Transferases.....	5
1.3.1 Funções e estrutura geral.....	5
1.3.2 Famílias de GST's.....	6
1.3.3 GST's citosólicas em bivalves	7
1.4 Dinâmica de MCs em bivalves	8
1.4.1 Absorção, distribuição e metabolização.....	9
1.4.2 GST's como biomarcadores em bivalves.....	10
1.5 Proteómica aplicada à toxicidade das MCs.....	11
2. Objetivos	12
3. Material e Métodos.....	13
3.1 Material biológico	13
3.1.1 Aclimação dos mexilhões	13
3.1.2 Cultivo da cianobactéria <i>Microcystis aeruginosa</i> e da alga verde <i>Chlorella vulgaris</i>	13
3.2 Preparação da MC-LR purificada e células de cultura de <i>M. aeruginosa</i>	13
3.2.1 Quantificação celular de cultura tóxica de <i>M. aeruginosa</i>	13
3.2.2 Extração da MC-LR da cultura de <i>M. aeruginosa</i>	14
3.2.3 Purificação da MC-LR por HPLC-PDA.....	14
3.2.4 Quantificação de MC-LR por HPLC-PDA	14
3.2.5 Nivelamento da toxicidade entre as duas exposições.....	15
3.3 Ensaio de exposição.....	16
3.4 Purificação das GST's citosólicas.	16

3.4.1 Extração das GST's	16
3.4.2 Quantificação da proteína	17
3.4.3 Determinação da actividade enzimática	17
3.4.4 Cromatografia de afinidade	17
3.5. Análise de proteínas por SDS-PAGE	18
3.6 Eletroforese bidimensional	19
3.6.1 Focagem isoeletrica (IEF)	19
3.6.2 SDS-PAGE	19
3.6.3 Aquisição de imagem e análise.....	20
3.6.4 Identificação das GST's por espectrometria de massa.....	20
3.7 Análise estatística	21
4. Resultados e Discussão.....	22
4.1 Purificação das GST's citosólicas	22
4.2 Caracterização das GST's citosólicas por SDS-PAGE e Electroforese Bidimensional	24
4.3 Efeitos da exposição às MCs	27
4.3.1 Atividade das GST's citosólicas	27
4.3.2 Expressão diferencial das GST's citosólicas	29
5. Conclusões e Perspetivas futuras.....	32
6. Referências.....	33
7. Anexos.....	41
7.1 Quantificação de MC-LR purificada por HPLC-PDA	41
7.1.1 Reta de Calibração	41
7.1.2 Cromatogramas do Sistema de HPLC	42

Índice de Figuras

Figura 1- Estrutura da microcistina-LR, como um exemplo da estrutura geral das MCs (Wiegand & Pflugmacher, 2005).....	3
Figura 2 - Conjugação da MC-LR com GSH via GST`s (Pflugmacher et al., 2001).....	5
Figura 3- Equação geral da reação catalisada pelas GST's. Neste exemplo o substrato utilizado é CDNB (1 cloro 2,4 - dinitrobenzeno) (Hayes <i>et al.</i> , 2005).	6
Figura 4 - SDS-PAGE das frações purificadas das brânquias e hepatopâncreas. a: marcador de peso molecular; b: brânquias; c: hepatopâncreas.....	25
Figura 5 - Perfil de expressão proteica em gel de eletroforese bidimensional (2-DE) obtido a partir de GST's citosólicas purificadas de Brânquias (A) e Hepatopâncreas (B) de <i>M. galloprovincialis</i>	26
Figura 6 - Actividade das GST's (fração Ultracentrifugada) nas brânquias e trato digestivo de <i>M. galloprovincialis</i> expostos a MC-LR pura e a células tóxicas de <i>M. aeruginosa</i> . As colunas representam a média de três réplicas. As barras representam o desvio-padrão. As diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente ao grupo de controlo estão assinaladas (*).	28
Figura 7 - Proteínas diferencialmente expressas nas brânquias em relação ao grupo controlo.	30
Figura 8 - Proteínas diferencialmente expressas no hepatopâncreas em relação ao grupo controlo.	30
Figura 9 - Gráfico da reta de calibração com os valores dos padrões 1 a 7.....	41
Figura 10 - Cromatogramas do sistema de HPLC referente a MC-LR Purificada, Extrato Bruto de <i>M. aeruginosa</i> , Padrão e Branco e os seus respetivos espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm.	42

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição das GST's citosólicas presentes em várias espécies de bivalves (sequências obtidas no GenBank) (Adaptado de Martins et al.(2014)).	8
Tabela 2 - Gradiente de eluição do HPLC para quantificação de MC-LR.	15
Tabela 3 - Volumes utilizados na preparação de 2 géis de separação a 12%.	18
Tabela 4 - Volumes utilizados na preparação de 2 géis de concentração a 5%.	18
Tabela 5 - Processo de purificação das GST's citosólicas das brânquias de <i>M. galloprovincialis</i> expostos a uma cultura de <i>M. aeruginosa</i> e MC-LR pura. U*: Unidades = $\mu\text{mol}/\text{min}$	23
Tabela 6 - Processo de purificação das GST's citosólicas do hepatopâncreas de <i>M. galloprovincialis</i> expostos a uma cultura de <i>M. aeruginosa</i> e MC-LR pura. U*: Unidades = $\mu\text{mol}/\text{min}$	23
Tabela 7 - Identificação das proteínas purificadas por cromatografia de afinidade das brânquias e hepatopâncreas de <i>M. galloprovincialis</i> não expostos.	26

Lista de abreviaturas

2DE – Eletroforese bidimensional.

Adda – Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8- trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico

APS – Persulfato de Amónia

CDNB - 1-Cloro 2, 4- dinitrobenzeno

cGST – Glutathione S-transferase citosólica

DTT - Ditionitroreitol

EIF - Focagem isoeletrica

ERA - Avaliação de Risco Ambiental

ETA - Ácido Etacrínico

GSH - Glutathione reduzida

GST – Glutathione S-transferase

HPLC-PDA - Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detetor de fotodiodos

IL-1 - Interleucina 1

KDa- Kilo Daltons

LEGE – Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução

MAPEG – Proteínas associadas a membrana- no metabolismo de eicosanóides e glutathione

MC-LR - Microcistina-LR

MCs - Microcistinas

Mdha – N-metil-desidroalanina

MeOH - Metanol

NaCl – Cloreto de Sódio

Nod - Nodularinas

NRPS – Síntese peptídica não-ribossomal

OATP - Polipéptido Transportador de Ânions Orgânico

pi – Ponto isoeletrico

PKS – Síntese de Policetídeos

PP1/PP2A – Proteína fosfatases 1/2A

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida de sódio de sulfato dodecil

TEMED - Tetrametiletilenediamina

TFA - Ácido Trifluoroacético

TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa.

γ -Glu - γ -Glutamil

1. Introdução

1.1 Cianobactérias

As cianobactérias são organismos procarióticos fotossintéticos com uma elevada capacidade de adaptação aos ecossistemas aquáticos. Geralmente constituem a maior proporção de fitoplâncton em ecossistemas dulciaquícolas eutrofizados (Carmichael, 1992; Vasconcelos, 1999). Em determinadas condições ambientais podem formar florescências ou “blooms”, atingindo densidades extremamente elevadas. As florescências de cianobactérias acontecem como consequência de uma combinação de certos fatores, nomeadamente elevadas cargas de nutrientes (amónia, nitratos e fosfatos), temperaturas elevadas e forte luminosidade.

As cianobactérias produzem como metabolitos secundários uma ampla diversidade de moléculas bioativas, algumas das quais com atividade tóxica: as cianotoxinas. Estas são produzidas essencialmente por cianobactérias dos géneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Planktothrix* (Carmichael, 2001). A exposição a cianotoxinas constitui um perigo real para a saúde humana e animal, sendo conhecidas por promover uma série de efeitos sub-letais e letais em animais e humanos (Codd *et al.*, 1997). De acordo com o seu modo de acção e efeito tóxico, as cianotoxinas podem ser divididas em diferentes classes: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas e toxinas irritantes (Chorus & Bartram, 1999).

1.2 Microcistinas

As Microcistinas (MCs) são cianotoxinas hepatotóxicas muito comuns, produzidas por membros de vários géneros, incluindo *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Anabaenopsis*, *Nostoc* e *Hapalosiphon* (Carmichael, 1992; Wiegand & Pflugmacher, 2005). No entanto, a grande maioria dos casos clínicos de intoxicação hepática atribuídos às MCs devem-se essencialmente a estirpes tóxicas de *M. aeruginosa*. Pelo facto de serem toxinas extremamente estáveis e resistentes à temperatura, hidrólise química e oxidação, persistem no meio ambiente, com implicações na saúde do biota e do Homem (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2010). Casos de contaminações de seres humanos continuam a ser reportados todos os anos, alguns deles resultando na morte dos indivíduos afetados. Na China por exemplo, dado o estado eutrófico da maioria dos recursos aquáticos daquele país, a contaminação por MCs através do consumo de peixes provenientes de lagos eutróficos com registo de blooms frequentes de cianobactérias

produtoras de toxina é já considerado um caso grave de saúde pública (Zhang *et al.*, 2009). Um dos casos mais graves de contaminação em humanos ocorreu no ano de 1996 em Caruaru, Brasil, onde 76 pacientes de uma clínica de hemodiálise morreram devido à ingestão de água contaminada com MC (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2010). Também as comunidades de organismos aquáticos são afectados pelas MCs. Muitos estudos têm demonstrado que as MCs exercem efeitos adversos em vários organismos aquáticos, como efeitos agudos (i.e. redução na sobrevivência e inibição da taxa de ingestão) e crónicos (i.e. redução no crescimento e fecundidade) (Ferrão-Filho, 2009). Efeitos bioquímicos, como a alteração da actividade de várias enzimas, além de efeitos comportamentais também têm sido descritos (Ferrão-Filho, 2009). Estudos de bioacumulação confirmam que as MCs são acumuladas pelos principais grupos de invertebrados (zooplankton, moluscos, macrocrustáceos) e vertebrados (peixes) aquáticos (Martins *et al.*, 2009).

As florescências de cianobactérias produtoras de biotoxinas nas quais se incluem as MCs afectam não só os sistemas de água doce e estuarinos, mas também os habitats marinhos. A evidência do fluxo destas toxinas para o mar e acumulação em organismos foi confirmada recentemente pela morte de mamíferos marinhos por intoxicação com MCs na América do Norte (Miller *et al.*, 2010). Considera-se que a via mais provável de exposição consistiu na transferência trófica destas toxinas através de invertebrados marinhos, nomeadamente de bivalves.

1.2.1 Estrutura e mecanismo de ação

As MCs são heptapeptídeos cíclicos (Figura 1) constituídos por um aminoácido específico ADDA (3-amino-9-methoxy-2-6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid), quatro aminoácidos D conservados [D-alanina (D-Ala), ácido D-eritro- β -metilaspártico (D-MeAsp), ácido D-isoglutâmico (D-Glu) e N-metil-desidro-alanina (Mdha)] e dois aminoácidos L variáveis (Botes *et al.*, 1985; WHO, 2003). Até à data foram descritas mais de 60 variantes estruturais com diferentes toxicidades. A variação ocorre sobretudo pela substituição dos aminoácidos variáveis nas posições 2 e 4 ou por desmetilações dos resíduos nas posições 3 e/ou 7 (Hitzfeld *et al.*, 2000; J. Martins *et al.*, 2009; WHO, 2003). A microcistina-LR (MC-LR) é uma das variantes mais tóxicas e mais comum, apresentando Leucina e Arginina nas posições 2 e 4, respectivamente (Dawson, 1997; Ibelings & Chorus, 2007; Saker *et al.*, 2005). Devido à elevada toxicidade da MC-LR, a Organização Mundial de Saúde, assumindo que cerca de 80% da exposição do ser humano a MCs se deve ao consumo de água contaminada, estabeleceu um valor de referência para a MC-LR em

água potável de 1 µg /L e instituiu como limite diário de ingestão tolerável 0,04 µg de MC por kg de peso corporal, (WHO, 2003).

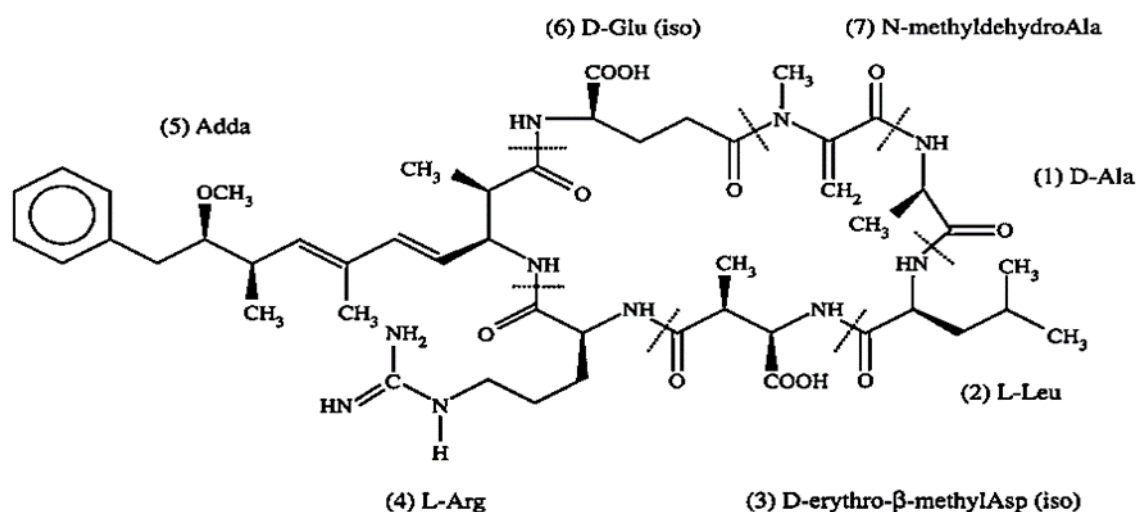


Figura 1- Estrutura da microcistina-LR, como um exemplo da estrutura geral das MCs (Wiegand & Pflugmacher, 2005).

As MCs penetram nos hepatócitos através de um sistema de transporte, envolvendo transportadores membranares polipeptídicos (OATP), também responsáveis pelo transporte de vários compostos orgânicos, tais como os ácidos biliares (Fischer *et al.*, 2005). O OATP é um sistema de transporte multiespecífico expresso em diversos tipos de células tais como os hepatócitos e os enterócitos, células epiteliais renais, e órgãos tais como o coração, pulmão, baço, pâncreas e cérebro. A distribuição sistêmica da MC depende, portanto, do grau de perfusão sanguínea e dos vários tipos e nível de expressão dos transportadores OATP (Feurstein *et al.*, 2009).

As MCs actuam ao nível da inibição das fosfatases proteicas de serina/treonina (enzimas reguladoras da atividade de outras enzimas através dos mecanismos de desfosforilação), mais concretamente as do tipo 1 e 2 (PPP1, PPP2) (Honkanen *et al.*, 1990; Martins *et al.*, 2009). A cadeia lateral do aminoácido Adda e o grupo carboxilo do ácido glutâmico desempenham um papel fundamental na toxicidade das MCs estabelecendo uma interação inicial não-covalente entre as fosfatases proteicas e as MCs (Craig *et al.*, 1996). Posteriormente estabelece-se uma ligação covalente entre o aminoácido Mdha das MCs e os resíduos de cisteína das fosfatases. A inibição das fosfatases proteicas de serina/treonina leva a um estado de hiperfosforilação das proteínas reguladoras da dinâmica de formação do citosqueleto dos hepatócitos, tendo como consequência a desintegração da estrutura dos mesmos (Craig *et al.*, 1996). Alguns estudos também sugerem que a inibição das fosfatases proteicas (PPP1 e PPP2)

decorrente da exposição crónica a MC-LR resulta numa proliferação celular descontrolada, potenciando o desenvolvimento de tumores (Dawson, 1997). No entanto, recentemente, novas evidências surgiram sugerindo que o stress oxidativo também é uma consequência toxicológica da exposição a MCs em diferentes organismos (Amado & Monserrat, 2010; Prieto *et al.*, 2006). O stress oxidativo é tradicionalmente definido como uma perturbação no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (radicais livres) e as defesas antioxidantes, em favor das primeiras, levando a potenciais danos moleculares (Halliwell & Gutteridge, 2007). A exposição a MCs tem sido relacionada com a produção de EROS (Li *et al.*, 2003), levando a danos no DNA (Zegura *et al.*, 2008), aumento na peroxidação lipídica (Prieto *et al.*, 2007), danos nas mitocôndrias (Ding & Ong, 2003) e alteração do sistema de defesa antioxidante (Amado *et al.*, 2009; Prieto *et al.*, 2007).

1.2.2 Metabolização e destoxificação de MCs

Apesar do conhecimento sobre a metabolização das MCs ser ainda limitado, vários trabalhos sugerem a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com MCs em hepatócitos como um passo importante na via metabólica que leva à destoxificação destas toxinas (Figura 2). Estes conjugados foram inicialmente detetados em estudos *in vivo* com ratos e murganhos tratados com MCs (-LR, -RR) (Kondo *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1991). A GSH tem um papel muito importante em diversas funções biológicas, nomeadamente na proteção celular. Este tripeptídeo reage com uma grande variedade de xenobióticos formando conjugados de GSH, sendo muitos deles convertidos em ácidos mercaptúricos para posteriormente serem excretados (Meister & Anderson, 1983).

A conjugação das MCs com GSH é catalisada pelas enzimas de destoxificação de fase II Glutathione Transferases (GST). Estas enzimas estão envolvidas na transformação de compostos endógenos e exógenos, conjugando substâncias eletrofílicas ao grupo tiol da GSH, tornando-as mais hidrossolúveis e facilitando, deste modo, o processo de excreção. As MCs são conjugadas com GSH através do terminal metileno do aminoácido Mdha ficando desta forma o conjugado impossibilitado de se ligar covalentemente com as fosfatases (Kondo *et al.*, 1996). No entanto, apesar de menos tóxico, pode ainda causar inibição das fosfatases visto que o aminoácido ADDA da MCs continua ainda disponível (Ito *et al.*, 2002). Nos mamíferos, a posterior conversão do conjugado GSH a ácido mercaptúrico ocorre pela clivagem sequencial do ácido glutâmico e glicina da GSH, seguido da N-acetilação do conjugado de cisteína resultante. Finalmente os ácidos formados são excretados pela urina (Huber *et al.*, 2008).

A formação do conjugado de GSH com MC-LR mediado pelas GST's foi também descrito em vários organismos aquáticos como plantas (*Ceratophyllum demersum*),

invertebrados (*Dreissena polymorpha*, *Daphnia magna*), peixes e embriões de peixes (*Danio rerio*) (Pflugmacher *et al.*, 1998; Wiegand *et al.*, 2002). Nestes organismos, a capacidade de destoxificação das MCs é fundamental devido ao contacto mais direto e frequente com estas toxinas.

Os sistemas enzimáticos de destoxificação como as GST's são úteis na avaliação da resposta animal a toxinas ou outros xenobióticos porque normalmente são induzidos pela presença destes agentes tóxicos no ambiente, sendo muitas vezes usados como biomarcadores (Vasconcelos *et al.*, 2007).

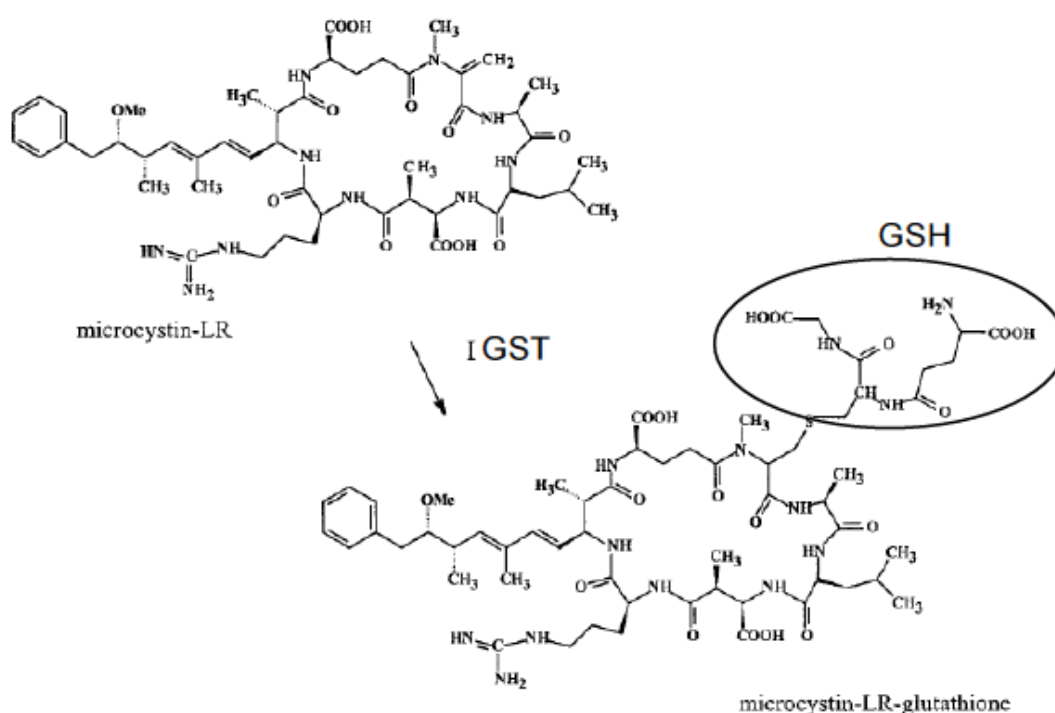


Figura 2 - Conjugação da MC-LR com GSH via GST's (Pflugmacher *et al.*, 2001)

1.3 Glutathione Transferases

1.3.1 Funções e estrutura geral

As enzimas de fase II do metabolismo de xenobióticos, como as GST's, catalisam a conjugação de xenobióticos (ou dos seus metabolitos oriundos da fase I) com substratos endógenos (por ex. GSH) tornando-os mais solúveis em água (Huber *et al.*, 2008). As GST's são uma família de enzimas multifuncionais com várias funções catalíticas, estando envolvidas na destoxificação de compostos endógenos e exógenos. Estas enzimas catalisam a conjugação de uma grande variedade de compostos electrofílicos (citotóxicos

e genotóxicos) ao grupo tiol do tripeptídeo GSH (Figura 3). Habitualmente o resultado desta reação é a formação de uma molécula mais polar e menos reativa, de maior facilidade de excreção (Mannervik & Jemth, 2001). Algumas das classes relativas à família de enzimas GST's são responsáveis pela remoção de EROS, apresentando actividade de peroxidases e isomerases. As GST's também desempenham algumas funções adicionais não ligadas à detoxificação. Estão por exemplo envolvidas na biossíntese de metabolitos fisiologicamente importantes (ex. prostaglandinas) ou no transporte de compostos endógenos (Frova, 2006).

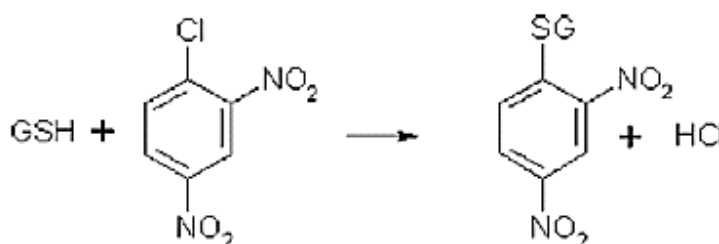


Figura 3- Equação geral da reação catalisada pelas GST's. Neste exemplo o substrato utilizado é CDNB (1 cloro 2,4 - dinitrobenzeno) (Hayes *et al.*, 2005).

As GST's são enzimas homodiméricas ou heterodiméricas que se encontram em diversas espécies (desde plantas a organismos superiores terrestres e aquáticos) e estão de uma maneira geral presentes em todos os órgãos, embora as suas concentrações sejam diferentes de tecido para tecido. Apesar das subunidades serem independentes cataliticamente, a estrutura dimérica é essencial para assegurar essa função (Frova, 2006). Cada subunidade é composta por dois domínios estruturalmente distintos: o domínio N-terminal, formado por *alpha*-hélices e folhas *beta*-pregueadas, e o domínio C-terminal, formado apenas por *alpha*-hélices (Frova, 2006). Há duas regiões de ligação por subunidade: o sítio G, específico para o tripeptídeo GSH, e o sítio H que pode acomodar uma multiplicidade de substratos de diferentes tamanhos e polaridades, dependendo da classe de GST (Clark, 1989; Vararattanavech & Ketterman, 2007).

1.3.2 Famílias de GST's

As GST's de mamíferos podem ser divididas em três grandes famílias: citosólicas, *Kappa* e microssomais. As duas primeiras compreendem enzimas solúveis, enquanto as do tipo microssomal encontram-se associadas à membrana (Huber *et al.*, 2008). No que respeita à estrutura tri-dimensional, as GST's solúveis são bastante distintas das

microssomais. No entanto, são características comuns a todas as famílias a actividade peroxidase e a conjugação de GSH com 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Frova, 2006). As GST's microssomais são proteínas trans-membranares geralmente envolvidas no metabolismo de eicosanóides e GSH e por esta razão são designadas pela sigla MAPEG (Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism). As GST's *Kappa* são enzimas mitocondriais (também presentes nos peroxissomas) potencialmente envolvidas em processos de destoxificação dos subprodutos da *beta*-oxidação de ácidos gordos e peróxidos lipídicos (Huber *et al.*, 2008).

As GST's citosólicas ou GST's solúveis representam a maior família de GST's, ubiquamente distribuídas entre os seres vivos, sendo reconhecidas como as enzimas de destoxificação mais envolvidas na defesa celular contra a toxicidade induzida quimicamente (Frova, 2006). Estas enzimas são, de uma maneira geral, biologicamente ativas como dímeros, com subunidades de 23-30 KDa e sequências de 200-250 aminoácidos (com mais de 40% de homologia). São sete as classes de GST's citosólicas presentes em mamíferos: *alpha*, *mu*, *pi*, *sigma*, *theta*, *omega*, e *zeta*. Estas classes não são exclusivas dos mamíferos, estando presentes todas elas em peixes ou moluscos. No entanto, existem classes de GST's citosólicas adicionais específicas de alguns grupos de organismos como as classes *phi* (plantas), *tau* (plantas), *rho* (peixes e moluscos), *delta* (insetos), *epsilon* (insetos) e *beta* (bactérias) (Blanchette *et al.*, 2007).

1.3.3 GST's citosólicas em bivalves

Existe pouca informação disponível relativamente às GST's de invertebrados aquáticos, nomeadamente para moluscos, em comparação com os vertebrados. Surpreendentemente, isoformas de GST's citosólicas começaram a ser isoladas e caracterizadas a partir de mexilhões há mais de duas décadas (Fitzpatrick & Sheehan, 1993). Diferentes classes de GST's em bivalves estão identificadas e descritas no GenBank (Tabela 1), embora apenas algumas tenham sido clonadas e caracterizadas.

Vários estudos sobre GST's em bivalves têm como foco o isolamento e caracterização individual dos vários tipos de isoformas. Há um grande interesse no estudo das mesmas devido ao seu envolvimento na proteção celular contra xenobióticos. O aumento da expressão das GST's faz parte dum mecanismo de resposta ao *stress* causado por tóxicos. Diferentes estudos sugerem que a indução das GST's é um fator decisivo na determinação da tolerância das células a vários contaminantes (Pérez-López *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Distribuição das GST's citosólicas presentes em várias espécies de bivalves (sequências obtidas no GenBank) (Adaptado de Martins *et al.*(2014)).

Espécies	<i>mu</i>	<i>pi</i>	<i>alpha</i>	<i>sigma</i>	<i>theta</i>	<i>zeta</i>	<i>omega</i>	<i>rho</i>
<i>Chlamys farreri</i>		x				x		
<i>Corbicula fluminea</i>		x						
<i>Crassostrea ariakensis</i>	x			x			x	
<i>Crassostrea gigas</i>	x			x			x	
<i>Cristaria plicata</i>		x						
<i>Dreissena polymorpha</i>		x						
<i>Hyriopsis schlegelii</i>		x						
<i>Lanternula elliptica</i>		x						x
<i>Mercenaria mercenaria</i>		x (2)						
<i>Mytilus edulis</i>		x						
<i>Mytilus galloprovincialis</i>		x	x	x (3)				
<i>Ostrea edulis</i>				x			x	
<i>Pinctada fucata</i>							x	
<i>Ruditapes philippinarum</i>	x	x		x (3)	x		x	x
<i>Saccostrea palmula</i>	x							
<i>Solen grandis</i>				x				
<i>Unio tumidus</i>		x						

() – número de isoformas

1.4 Dinâmica de MCs em bivalves

Os bivalves são vulgarmente usados como bioindicadores na avaliação de risco ambiental. Estes moluscos são organismos sésseis e filtradores, permitindo que acumulem rapidamente elevados níveis de contaminantes nos seus tecidos, refletindo desta forma os níveis de contaminação ambiental. Apresentam muitas respostas fisiológicas subletais, sensíveis a poluentes em diferentes níveis. A sua utilização em programas de biomonitoração por parte de instituições ligadas à vigilância sanitária é bastante comum, visto que muitas das espécies são também consumidas pelo Homem (Vasconcelos, 1995). Entre estas está o mexilhão *Mytilus galloprovincialis*. Este bivalve marinho é natural da costa do Mediterrâneo, do Mar Negro e do Mar Adriático, tornando-se invasora em muitas partes do mundo (Branch & Steffani, 2004; Lee & Morton, 1985). Atualmente ocorrem em zonas temperadas em ambos os hemisférios, estando ausente nos trópicos (Hilbish *et al.*,

2000). Normalmente atingem massas densas de indivíduos na zona intertidal e subtidal de águas costeiras e estuários. São muitas vezes dominantes nos seus habitats, provavelmente devido à sua notável plasticidade em relação às mudanças ambientais, e amplamente utilizados como bioindicadores de poluição química da água (Goldberg & Bertine, 2000). A acumulação de cianotoxinas, nomeadamente de MCs foi demonstrada em vários trabalhos de campo e laboratoriais para várias espécies de bivalves, nomeadamente do género *Mytilus* sp. (Martins *et al.*, 2009)

1.4.1 Absorção, distribuição e metabolização

Os bivalves, como organismos sésseis e filtradores, estão entre o grupo de animais aquáticos mais sujeitos aos blooms de cianobactérias tóxicas (Martins & Vasconcelos, 2009). A intoxicação por MCs nestes moluscos pode acontecer através da ingestão de células cianobacterianas produtoras destas toxinas ou através da absorção das MCs dissolvidas na água, libertadas após lise celular. Alguns estudos sustentam que a acumulação de MCs em moluscos resulta principalmente da ingestão direta de células de cianobactérias tóxicas (Lance *et al.*, 2010; Prepas *et al.*, 1997).

Nos bivalves, as brânquias e o manto representam os primeiros locais de interação com os contaminantes biodisponíveis a partir do meio circundante (coluna de água, sedimentos água intersticial) e/ou o alimento ingerido. Estes moluscos utilizam as brânquias para obter alimento filtrando as partículas que existem em suspensão na água (Gosling, 1992; Gosling, 2003). A água atravessa as lamelas branquiais através de movimentos ciliares, sendo as partículas transportadas até aos palpos labiais e boca. As partículas são posteriormente conduzidas para o hepatopâncreas, onde tem lugar a digestão (Gosling, 2003).

Segundo alguns estudos, as quantidades de MCs nos tecidos destes invertebrados parecem depender do nível de MCs no fitoplâncton, variando de acordo com a ocorrência de cianobactérias produtoras de MCs (Lance *et al.*, 2010; Papadimitriou *et al.*, 2012; Poste *et al.*, 2011). Existem vários estudos sobre a bioacumulação de MCs em bivalves, tanto em laboratório como no campo (Martins *et al.*, 2009). Bivalves marinhos como *M. galloprovincialis* mostraram acumular (tecido total) até 10,7 µg de MCs /g de peso seco em experiências laboratoriais, quando alimentados com uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa* (Amorim & Vasconcelos, 1999). Os dados disponíveis confirmam que as MCs não são igualmente distribuídas entre os vários órgãos de invertebrados, com os tecidos viscerais (hepatopâncreas, intestino) a atingir as toxicidades mais elevadas (Martins *et al.*, 2009). Os mexilhões mostram ser bastante tolerantes às toxinas, registando-se nas várias experiências laboratoriais taxas de mortalidade muito baixas ou nulas (Vasconcelos, 1995).

De uma maneira geral, os mesmos estudos laboratoriais mostram que as MCs são eliminadas bifasicamente a partir dos tecidos de *M. galloprovincialis*, compreendendo uma fase inicial de eliminação mais rápida seguida por uma subsequente mais lenta (Amorim & Vasconcelos, 1999; Fernandes *et al.*, 2009; Vasconcelos, 1995).

A via metabólica que leva à destoxificação das MCs em bivalves parece ser semelhante à dos mamíferos. A biotransformação de MC-LR por conjugação com GSH foi demonstrada *in vitro* com um extrato de GST's de *Dreissena polymorpha* (Pflugmacher *et al.*, 1998). Estes conjugados foram posteriormente detetados em estudos *in vivo* com bivalves, nomeadamente em *Cristaria plicata* (J. Chen & Xie, 2005). Além disso, verificou-se um aumento das atividades das GST's em várias espécies de bivalves após exposição a extratos brutos de cianobactérias e MC-LR pura, nomeadamente em *M. galloprovincialis* (Fernandes *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2007).

1.4.2 GST's como biomarcadores em bivalves

São vários os parâmetros biológicos que podem ser alterados como consequência da interação entre um agente químico e o organismo. A determinação quantitativa desses parâmetros pode ser usada como indicador biológico ou biomarcador no caso de existir uma correlação com a intensidade da exposição e/ou com o efeito biológico da substância (Amorim, 2003). Desta forma, o biomarcador compreende todas as substâncias ou os seus produtos de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos ou tecidos avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde (Amorim, 2003). Os biomarcadores são cada vez mais utilizados para identificar a incidência e os efeitos de diferentes tóxicos na avaliação de risco ecológico do ecossistema (Bebianno *et al.*, 2007).

As respostas bioquímicas em moluscos bivalves têm sido empregues como biomarcadores em vários estudos que visam avaliar o impacto das atividades antrópicas no meio ambiente (Cajarville *et al.*, 2000). Entre os marcadores bioquímicos destacam-se os relacionados com a biotransformação de compostos orgânicos, defesas antioxidantes e stress oxidativo, como por exemplo, as enzimas GST's. A atividade destas enzimas tem sido amplamente utilizada como um biomarcador de exposição em bivalves a vários tóxicos, tais como: hidrocarbonetos, inseticidas organoclorados, bifenilos policlorados (PCB's) (Hoarau *et al.*, 2001; Fitzpatrick *et al.*, 1997), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's) (Cheung, Zheng, Li, Richardson, & Lam, 2001), cloreto de mercúrio (HgCl₂) (Khessiba *et al.*, 2001) e também a cianotoxinas como MCs (Pflugmacher *et al.*, 1998) e Nodularinas (Kankaanpää *et al.*, 2007). Para além da atividade, também a expressão dos genes relativos a várias isoformas de GST's têm sido estudados como

biomarcadores de exposição. Por exemplo, a transcrição da isoforma de classe-pi foi avaliada em *M. galloprovincialis* e *R. phillipinarum* expostos a PAH's (Hoarau *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010). Relativamente às MCs, apenas estudos com peixes (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*) demonstraram a alteração do padrão de transcrição de alguns genes de GST's (Fu & Xie, 2006; Li *et al.*, 2008).

1.5 Proteômica aplicada à toxicidade das MCs

A análise proteômica comparativa é uma ferramenta importante na investigação das respostas celulares a agentes tóxicos. Em contraste com os métodos bioquímicos convencionais, esta análise oferece um grande potencial na identificação de proteínas envolvidas na resposta dos organismos a contaminantes, através da comparação de perfis de expressão proteica (Dowling & Sheehan, 2006; Wetmore & Merrick, 2004). São várias as vantagens da proteômica comparativa em relação a outras abordagens. Esta análise não exige conhecimento prévio dos mecanismos de toxicidade, avaliando em larga escala as alterações da expressão de proteínas (Apraiz *et al.*, 2006). A proteômica pode também ajudar a identificar novos biomarcadores e a estabelecer os seus mecanismos de toxicidade, após alteração dos perfis de expressão causada pela exposição a tóxicos (Apraiz *et al.*, 2006). No entanto, a utilização de abordagens proteômicas no âmbito da toxicologia ambiental é sobretudo limitada pela falta de informação nas bases de dados de sequências de proteínas e genes para as espécies sentinela mais populares. Os organismos com mais informação disponível (organismos modelo) como bactérias, fungos e plantas, não são tão amplamente usados em estudos ecotoxicológicos, sendo que para a maioria das espécies, a informação genética disponível é escassa ou ausente (López-Barea & Gómez-Ariza, 2006; Monsinjon & Knigge, 2007).

Os primeiros estudos ecotoxicológicos que recorreram à proteômica foram realizados em mexilhões e peixes expostos a poluentes comuns (Bradley *et al.*, 2002; Shepard & Bradley, 2000; Shepard *et al.*, 2000). Em relação à toxicidade de MCs, a maioria das abordagens proteômicas com esta toxina envolvem a identificação dos mecanismos de toxicidade envolvidos nos efeitos de MC-LR ou de culturas produtoras destas toxinas em mamíferos, peixes e bivalves (Chen *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009; Mezhoud *et al.*, 2008).

2. Objetivos

A informação disponível sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade e metabolismo de MCs em organismos contaminados é ainda relativamente limitada. No caso dos organismos aquáticos e mais especificamente dos bivalves, são vários os trabalhos que avaliam a acumulação e depuração destas toxinas nestes moluscos. No entanto, são ainda escassos os estudos relativos à indução de respostas moleculares pelas MCs, nomeadamente ao nível da destoxificação destas toxinas. Apesar de conhecido o envolvimento do sistema de enzimas de destoxificação GST na resposta molecular a MCs nestes moluscos, pouco se sabe ainda sobre o papel individual de cada uma das isoformas das várias classes nessa resposta.

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar as alterações da expressão de GST's citosólicas do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* induzidas por MCs, usando uma análise proteómica. Pretenderam-se alcançar os seguintes objetivos específicos:

1. Definir mapas bidimensionais e identificar as várias isoformas GST citosólicas nas brânquias e hepatopâncreas de *M. galloprovincialis*.

2. Avaliar as alterações da atividade total das GST's citosólicas e da expressão das várias isoformas GST citosólicas nas brânquias e hepatopâncreas de *M. galloprovincialis* induzidas por uma cultura tóxica de *Microcystis aeruginosa* (LEGE 91094) e MC-LR pura.

3. Material e Métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 Aclimação dos mexilhões

Os bivalves (*Mytilus galloprovincialis*) foram recolhidos no mês de Abril de 2014 na praia da Memória (Porto, Portugal), aceite como local de referência, por não se conhecerem fontes de poluição significativas (Puerto *et al.*, 2011). Seguidamente foram aclimatados durante 5 dias em água salgada (≈ 33 ppt), à temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, em tanques de 40 litros, com arejamento. A água foi mudada de dois em dois dias e os organismos foram alimentados duas vezes por semana com *Chlorella vulgaris* (LEGE Z-001) com uma densidades de 1×10^5 células/mL.

3.1.2 Cultivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e da alga verde *Chlorella vulgaris*.

A cianobactéria usada nesta experiência foi uma estirpe tóxica de *Microcystis aeruginosa* (LEGE 91094) produtora essencialmente de MC-LR (95%) e de pequenas quantidades de MC-LA e [D-Asp³]-MCYST-LR (Martins *et al.*, 2009; Vasconcelos, 1995). A cultura tóxica de *M. aeruginosa* foi cultivada em frascos de 10L contendo 8L de meio Z8 num regime de luz/obscuridade de 14/10h com luz branca fluorescente ($22 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). A alga verde *C. vulgaris* cresceu em frascos de 2L contendo 1L de meio Z8, tendo sido sujeita às mesmas condições da *M. aeruginosa*.

3.2 Preparação da MC-LR purificada e células de cultura de *M. aeruginosa*

3.2.1 Quantificação celular de cultura tóxica de *M. aeruginosa*

Esta quantificação foi determinada por contagem de células ao microscópio de luz com o auxílio de câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer é uma câmara de contagem formada por duas grelhas. Cada uma destas grelhas tem centralmente uma subgrelha de 25 quadrículas (5 x 5), cada uma das quais também dividida em 16 subquadrículas (4 x 4).

Uma amostra representativa da cultura de *M. aeruginosa* foi introduzida, com uma pipeta de Pasteur, entre a lamela e a câmara, de forma a cobrir a zona das grelhas. Depois

de preparada, a câmara foi colocada no microscópio e procedeu-se então à contagem. A contagem foi feita na subgrealha central de 25 quadrículas (5 x 5). Foram contabilizados o número de células nas quadrículas dos cantos e central. Foram realizadas três réplicas da contagem. De seguida foi aplicada a seguinte equação para determinar a densidade da cultura:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/mL} = \text{média total do n}^{\circ} \text{ de células} \times 25 \text{ quadrículas} \times 10^4$$

3.2.2 Extração da MC-LR da cultura de *M. aeruginosa*

A biomassa de 4L da cultura de *M. aeruginosa* foi recolhida por centrifugação a 4600 *xg* durante 10 minutos a 4°C (Sorvall RT Legend Benchtop Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). O sobrenadante resultante foi descartado e os *pellets* agrupados num único recipiente, tendo sido armazenados a -20°C para uma posterior extração e purificação. O solvente de extração, MeOH (50% v/v) foi usado para ressuspender o *pellet*, que foi seguidamente sonicado (Vibracell 50, Sonics & Material Inc., Danbury, CT, Estados Unidos) a 60 Hz por 1 minuto, 5 vezes, num banho de gelo, para induzir a lise celular. Após a separação do sobrenadante, o *pellet* resultante voltou a sofrer o mesmo processo de extração. Os dois sobrenadantes resultantes de ambos os passos da extração foram combinados e armazenados a 4°C. O extrato de MC-LR concentrado por centrifugação foi em seguida purificado e quantificado por HPLC-PDA (cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detetor de fotodiodos).

3.2.3 Purificação da MC-LR por HPLC-PDA

A purificação da MC-LR foi realizada num sistema de HPLC, Alliance e2695 acoplado ao PDA 2998 (waters, Milford, MA, Estados Unidos), equipado com uma coluna de fase reversa C18 da Phenomenex (Luna RP-18 25 cm x 10 mm, 10 µm) mantida a 45°C. A eluição isocrática foi realizada com metanol 60% acidificado com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), com um fluxo de 1,5 mL/min. O volume injetado foi de 200 a 500 µL. A pureza de pico e a percentagem de MC-LR purificada foram calculadas aos 214 nm e 238 nm.

3.2.4 Quantificação de MC-LR por HPLC-PDA

A quantificação da toxina foi realizada de acordo com Ramanan *et al.* (2000) com algumas alterações. A fração de MC-LR purificada foi quantificada no mesmo sistema de

HPLC utilizando a coluna Lichrospher 100 RP-18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) mantida a uma temperatura de 45°C. A solução padrão de MC-LR usada para calibração do aparelho foi obtida na Cyano Biotech GmbH (Berlim, Alemanha, lote nº 018K1209), com concentração de 10,025 µg/mL e pureza de 98%. A calibração do sistema foi feita a partir de 7 diluições desta solução padrão de MC-LR (0,5 a 20 µg mL⁻¹) em metanol 50%. Todos os solventes usados foram filtrados (Pall GH Polypro 47 mm, 0,2 µm, Pall Corporation, Port Washington, NY, Estados Unidos) e desgaseificaram-se com um banho de ultra-sons (Sonorex[™] Super RK 100H, Bandelin, Berlim, Alemanha). O intervalo do PDA usado foi entre 210-400 nm com um comprimento de onda fixo de 238 nm. As condições usadas para o gradiente linear de eluição foram as seguintes:

Fase móvel:

- **A:** Metanol (MeOH) + TFA 0,1% (v/v)
- **B:** Água Milli-Q + TFA 0,1% (v/v)

Tabela 2 - Gradiente de eluição do HPLC para quantificação de MC-LR.

Tempo (min.)	Canal A - MeOH (%)	Canal B - H₂O Milli-Q (%)
0	55	45
5	65	35
10	80	20
15	100	0
15,1 - 20	55	45

Foi usado um fluxo de 0,9 mL/min, com um volume de injeção de 20 µL. Cada padrão de MC-LR e cada amostra foram injetadas em duplicado. O *software* usado para os cálculos e para obter o relatório de informação dos picos foi o Empower 2 Chromatography. A MC-LR foi detetada pela absorvância UV (ultravioleta) aos 238 nm e quantificada, comparando as áreas dos picos dos cromatogramas e os tempos de retenção entre os padrões e as amostras. O pico de MC-LR teve o seu tempo de retenção aos 8,60 minutos.

3.2.5 Nivelamento da toxicidade entre as duas exposições

Antes da cultura de *M. aeruginosa* ser purificada, quantificou-se a densidade celular presente nos 4 L. Através do resultado da concentração de MC-LR purificada obtida por HPLC, foi estabelecida uma relação entre a biomassa de MC-LR por célula. Esta relação

foi então usada para determinar a densidade celular da cultura da cianobactéria à qual a toxicidade seria equiparável à exposição com MC-LR purificada.

3.3 Ensaio de exposição

Os mexilhões foram sujeitos a dois tipos de exposição: a MC-LR purificada e a células de uma cultura tóxica de *M. aeruginosa*. Foram realizadas 3 réplicas para o controlo e para as duas exposições. Cada réplica consistiu em 10 bivalves (comprimento $6,5 \pm 0,2$ cm) expostos em 2,5 L de água salgada (≈ 33 ppt), à temperatura de 18 ± 1 °C e com arejamento durante 24 horas. Os bivalves foram expostos a 100 µg/L de MC-LR purificada e a uma densidade de células de *M. aeruginosa* ($9,32 \times 10^4$ células/mL) com a mesma concentração de toxina (100 µg/L).

No controlo e na exposição à MC-LR purificada foi adicionada uma densidade de células da alga verde *C. vulgaris* igual à usada na exposição com a cultura de *M. aeruginosa*. Esta mistura tinha como objetivo diminuir as diferenças entre tratamentos e prevenir o efeito inibitório da exposição à MC-LR purificada. Após exposição, as brânquias e o hepatopâncreas foram removidos dos bivalves, pesados e imediatamente congelados em azoto líquido a -80°C até uso posterior.

3.4 Purificação das GST's citosólicas.

3.4.1 Extração das GST's

Recorrendo a azoto líquido, o material biológico de ambos os órgãos foi reduzido a um pó fino com o auxílio de um pilão e um almofariz. Ao material biológico foi adicionado tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 (1,4 M DTT; 0,1 mM EDTA e 10% (v/v) glicerol) na proporção de 1 g de peso fresco de tecido por 1 mL de tampão e inibidores de protease (10 µL/mL). O homogeneizado foi centrifugado a 4600 xg durante 10 minutos (4°C) (Sorvall RT Legend Benchtop Centrifuge) e o sobrenadante resultante submetido a ultracentrifugação (Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, CA, Estados Unidos) a 100000 xg por 1h (4°C). As amostras foram concentradas por centrifugação com as colunas Vivaspin com filtros para pesos moleculares de 10 kDa (Colunas Vivaspin 2, VS0202, Sartorius Stedium Biotech, GmbH, 37070, Goettingen, Alemanha).

3.4.2 Quantificação da proteína

Nas frações purificadas a quantificação da proteína foi realizada por NanoDrop (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). O método baseia-se na absorvância da amostra a 280 nm. Devido à sensibilidade do aparelho apenas 2 µl de amostra são necessários para quantificar a proteína total.

Nas restantes amostras, a quantidade de proteína total foi determinada usando o Método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado a microplaca, utilizando albumina sérica como proteína-padrão e Azul Brilhante de Coomassie G-250 como reagente. Todas as determinações foram feitas em triplicado. A absorvância foi lida num leitor de microplacas (Synergy HT, 2009, BioTek, Winooski, VT, Estados Unidos) a 595 nm, após um período de incubação de 15 minutos.

3.4.3 Determinação da actividade enzimática

A actividade da enzima GST foi determinada pelo método espectrofotométrico de Habig (Habig *et al.*, 1974) adaptado a microplaca. Este método baseia-se na conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a GSH, pela ação das GST's, originando um produto conjugado cuja formação pode ser monitorizada a um comprimento de onda de 340 nm. Em cada poço adicionou-se (num volume final 300 µl) tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5; 1 mM CDNB, 1 mM GSH e 100 µL de amostra ou tampão de eluição (para o branco). Foram efetuadas três determinações por amostra. A absorvância foi lida, a 25°C, num leitor de microplacas (Synergy HT, 2009, BioTek, Winooski, VT, Estados Unidos) a 340 nm, de 20 em 20 segundos, durante 5 minutos. A actividade da GST é expressa em nmol de substrato hidrolisado por minuto por miligrama de proteína.

3.4.4 Cromatografia de afinidade

A purificação das GST's foi efetuada recorrendo a colunas com uma matriz de agarose-GSH (Pierce Glutathione Spin Columns, Thermo Scientific, Portugal). Seguindo-se o procedimento recomendado nas instruções do fornecedor: equilibração das colunas com tampão de 50 mM Tris, 150 mM NaCl a pH 8,0; adição das amostras, previamente niveladas pela concentração proteica (período de incubação de 30 minutos); lavagem (tampão 50 mM Tris, 150 mM NaCl a pH 8,0), e por fim eluição com tampão composto por 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM GSH a pH 8,0. Este último passo foi repetido quatro vezes, tendo sido obtido o mesmo número de frações para cada amostra. Para cada uma das frações foi realizada a quantificação da proteína por NanoDrop e determinada a

actividade enzimática. A fração que demonstrava maior quantidade proteica foi a utilizada posteriormente na separação por eletroforese.

3.5. Análise de proteínas por SDS-PAGE

Os perfis proteicos das frações purificadas de ambos os órgãos foram analisados por eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram preparados géis de acrilamida de separação a 12% (w/v) (Tabela 3) e de concentração a 5% (w/v) (Tabela 4).

Tabela 3 - Volumes utilizados na preparação de 2 géis de separação a 12%.

Reagentes	Volumes
H ₂ O Destilada (mL)	3,44
Acrilamida ((30% w/v), 37,5:1) (mL)	3,96
Tampão (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8) (mL)	2,5
SDS (10%, w/v) (mL)	0,1
APS (10%, w/v) (μL)	50
TEMED (μL)	5

Tabela 4 - Volumes utilizados na preparação de 2 géis de concentração a 5%.

Reagentes	Volumes
H ₂ O Destilada (mL)	2,85
Acrilamida ((30% w/v), 37,5:1) (mL)	0,85
Tampão (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)	2,5
SDS (10%, w/v) (mL)	50
APS (10%, w/v) (μL)	25
TEMED (μL)	5

Após polimerização, os géis foram colocados num sistema Mini-Protean (Hercules, CA, EUA) e foi adicionado o tampão de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0,1% SDS). Posteriormente, as amostras foram misturadas com tampão de carregamento (50 mM Tris- HCl; pH 6,8; 2% SDS (m/v); 0,1 M DTT; 20% glicerol (v/v); 0,01 % de azul de bromofenol (m/v)). Foram aquecidas a 95°C, durante 3 minutos, seguindo-se a sua aplicação nos poços do gel, num volume correspondente a uma quantidade de proteínas de 20 μg por poço. Foram aplicados 4 μL de um marcador de massas moleculares por gel

(Bio.Rad, Ref. 161-0318). As proteínas foram separadas a uma voltagem de 30 V durante 30 minutos, aumentando de seguida para 150 V por mais 1 hora.

Após a eletroforese terminar procedeu-se à coloração com Azul de Coomassie Coloidal de acordo com Neuhoff *et al.* (1988) e Heinemeyer *et al.* (2007). Os géis foram fixados em metanol (40%, v/v) e ácido acético (10%, v/v). De seguida foram corados com uma solução de 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250; 2% ácido orto-fosfórico; 9,8% sulfato de amónia, sendo que a esta solução foi ainda adicionado 20% MeOH.

3.6 Eletroforese bidimensional

As frações purificadas de ambos os órgãos e dos vários tratamentos foram separadas por eletroforese bidimensional (2DE). Esta técnica combina a separação baseada no ponto isoeletrico (pI) numa primeira dimensão, por focagem isoeletrica e a separação por peso molecular (MW) numa segunda dimensão, por SDS-PAGE.

3.6.1 Focagem isoeletrica (IEF)

Cada amostra de proteína purificada foi dissolvida numa solução de reidratação constituída por tampão de ressolubilização [ureia (7 M), tiourea (2 M), CHAPS (4%, w/v), ditioneitol (DTT) (65 mM) e anfólitos, pH 3 – 10 (0,8%, v/v)] e azul de bromofenol. Um volume total de 125 µL desta solução, contendo 25 µg de proteína, foi usado para reidratar as tiras de pH imobilizado (IPG) de 7 cm, pH 5-8 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A focagem das amostras foi realizada no sistema IEF Cell da Biorad (Hercules, CA, EUA), a 20 °C, utilizando o seguinte programa: 0– 4000 V, rapid voltage ramp, 5000 V h⁻¹. No final as tiras IPG foram armazenadas a -20 °C, até ser realizada a segunda dimensão.

3.6.2 SDS-PAGE

Antes da segunda dimensão, cada tira IPG foi equilibrada em 2,5 ml de ureia (6 M), SDS (2%), Tris –HCl (50 mM), pH 6,8 glicerol (30%), azul de bromofenol e DTT (65 mM) durante 15 minutos, seguido por 15 minutos com Iodoacetamida (260 mM) em substituição do DTT. Cada uma das tiras foi posteriormente colocada no topo de um gel SDS-PAGE (1 mm, 10% de acrilamida). Os marcadores de peso molecular foram carregados em papel de filtro e colocados ao lado da tira de IPG. Foi usada uma solução de agarose (0,5%, w/v) fundida para cobrir a tira IPG e o filtro de papel. Os géis correram num sistema Mini-Protean (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), inicialmente a 30 V durante 30 minutos aumentando-se

posteriormente para 150 V até que a linha de azul de bromofenol atingisse a parte inferior dos géis. Após a eletroforese procedeu-se à coloração dos géis com Azul de Coomassie Coloidal, de acordo com o protocolo referido no ponto 3.5.

3.6.3 Aquisição de imagem e análise

As imagens dos géis 2DE (400 dpi) foram adquiridas usando um Densitómetro Calibrado GS-800 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e analisadas utilizando o *software* PDQuest 2-D Analysis (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As intensidades dos pontos foram normalizadas em relação à densidade total do gel. Para a deteção dos pontos, primeiramente foi feito o *matching* automático pelo *software*, seguido pela verificação manual das correspondências. A análise das diferenças de expressão proteica quantitativas e qualitativas foram efetuadas com base em duas réplicas por tratamento. Nesta análise foram apenas considerados os pontos presentes nos 2 géis de qualquer tratamento que apresentassem uma diferença mínima de 10 vezes sobre a densidade base de fundo do gel. Na análise quantitativa estabeleceu-se um fator mínimo de variação de abundância de 5 vezes dos grupos de exposição em relação ao grupo controlo. Na análise qualitativa foi detetada a presença/ausência dos pontos dos grupos de exposição em relação ao grupo controlo.

3.6.4 Identificação das GST's por espectrometria de massa.

Os pontos de interesse foram excisados manualmente a partir dos géis, colocados em tubos de microcentrifuga estéreis contendo água ultra-pura e armazenados a -4°C até à digestão. Para este processo, os fragmentos de gel foram descorados procedendo-se a uma primeira lavagem com água ultrapura e duas adicionais com acetonitrilo (ACN) 50% (v/v). De seguida adicionou-se ACN (100%) e os fragmentos foram desidratados no speedvac. De seguida procedeu-se à redução e alquilação das proteínas adicionando DTT (25 mM) preparado em NH_4HCO_3 (50 mM), e iodoacetamida (55 mM) preparada em NH_4HCO_3 (100 mM) respetivamente. Posteriormente, os fragmentos foram novamente desidratados sendo expostos gradualmente a H_2O ultra-pura, ACN (50%) e ACN (100%) sendo seguidamente secos no speedvac. Os fragmentos de gel foram reidratados com 6,7 ng/ μL de uma solução de tripsina (Promega, Madison, WI, EUA) (Campos et al., 2013) com surfactante (NH_4HCO_3 50 mM). A incubação durou 30 min em gelo. De seguida adicionamos o tampão de digestão (NH_4HCO_3 , 50 mM) e as proteínas ficaram a incubar por 4 horas a 37 °C. A solução contendo os péptidos foi recolhida para um novo eppendorf e armazenadas a -20°C.

As proteínas digeridas foram depois dessalinizadas e concentradas utilizando micro-colunas C18 (Millipore, Bedford, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As colunas começaram por ser equilibradas com ACN 100% seguidas de TFA 0,1%. De seguida as amostras foram aspiradas e lavadas com TFA 0,1%. As proteínas foram eluídas com a matriz uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (5-10 mg/mL) em 50% de ACN/0,1% de TFA. As amostras foram analisadas usando o espectrómetro de massa 4800 Plus MALDI TOF/TOF (AB SCIEX, Framingham, MA, EUA). Os dados das impressões digitais da massa peptídica foram recolhidos em modo refletor MS positivo, na gama de 700-4000 rácio de massa-carga (m/z), sendo calibrado internamente usando os picos da autólise da tripsina. Os picos de intensidade mais elevada foram selecionados para análise de MS em paralelo (MS/MS). Os espectros foram analisados por meio de GPS Explorer (versão 3.6; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram investigados os dados de MS/MS em conjunto com uma cópia armazenada localmente no NCBI nr e SwissProt usando o motor de busca Mascot (Version 2.1.04) (Perkins *et al.*, 1999). A classificação taxonómica do *Mytilus galloprovincialis* foi considerada para esta análise.

3.7 Análise estatística

Os dados obtidos para a actividade enzimática foram analisados no *software* SPSS (versão 22.0 para Windows). Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk de forma a verificar se as variáveis seguiam uma distribuição normal ($p > 0,05$). Quando as variáveis seguiam uma distribuição normal os dados foram sujeitos a uma análise paramétrica através do teste t para amostras independentes e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a um $p < 0,05$. Quando as variáveis não apresentaram uma distribuição normal e a sua transformação não foi possível optou-se por uma análise não paramétrica através do teste Mann-Whitney U sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas a um $p < 0,05$. Todos os gráficos foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

4. Resultados e Discussão

Os organismos aquáticos estão especialmente sujeitos ao contacto mais direto e frequente com as MCs. Nestes organismos, o processo de destoxificação representa uma adaptação biológica de importância fundamental que pode influenciar a capacidade destes em sobreviver a situações de florescências de cianobactérias. A formação de conjugados de MC-LR-GSH foi demonstrada *in vitro* em vários organismos aquáticos, incluindo bivalves, e é sugerida como o primeiro passo na destoxificação de MCs nestes organismos (Stephan Pflugmacher *et al.*, 1998). No entanto, as GST's compreendem um vasto conjunto de isoformas, pouco se sabendo sobre o papel individual de cada uma no processo de destoxificação de MCs. Uma maior eficiência do processo de destoxificação pode resultar numa maior resistência dos organismos a florescências de cianobactérias tóxicas. A diversidade das isoformas GST's e a sua promiscuidade catalítica pode ser entendida como uma vantagem em situações de *stress* químico. Deste modo, a identificação de isoformas específicas envolvidas, individualmente ou não, na biotransformação e biodegradação de xenobióticos é fundamental. Neste trabalho foram estudadas as alterações da expressão das GST's citosólicas nas brânquias e hepatopâncreas do mexilhão *M. galloprovincialis* induzidas pela exposição a MC-LR purificada e a uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa*.

4.1 Purificação das GST's citosólicas

As GST's citosólicas das brânquias e hepatopâncreas de *M. galloprovincialis* submetidos a MC-LR e à estirpe de *M. aeruginosa* foram purificadas recorrendo à cromatografia de afinidade em coluna GSH-agarose. As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados das várias etapas dessa purificação para cada uma das condições de exposição em ambos os órgãos. As etapas compreendem o extrato após centrifugação a 4600 *xg* (Extrato bruto), o extrato após centrifugação a 100000 *xg* (Ultracentrifugado) e por último a fração obtida após purificação com cromatografia de afinidade (Eluato de afinidade).

Os resultados obtidos demonstram que o processo de purificação das GST's citosólicas adotado neste estudo permitiu obter níveis semelhantes de rendimento e de aumento da atividade específica para cada uma das condições de exposição, em ambos os órgãos.

Tabela 5 - Processo de purificação das GST's citosólicas das brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a uma cultura de *M. aeruginosa* e MC-LR pura. U*: Unidades = $\mu\text{mol}/\text{min}$

Frações	Proteína Total (mg)	Atividade (U*)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Não-expostos					
Extrato bruto	67,33 \pm 9,92	32,54 \pm 8,58	0,48 \pm 0,06	1	100
Ultracentrifugado	52,23 \pm 7,06	28,58 \pm 5,97	0,54 \pm 0,04	1,14	88
Eluato de afinidade	0,08 \pm 0,03	0,63 \pm 0,09	10,55 \pm 2,05	22,1	1,9
MC-LR Purificada					
Extrato bruto	63,50 \pm 3,75	35,68 \pm 3,51	0,84 \pm 0,45	1	100
Ultracentrifugado	52,97 \pm 2,78	35,7 \pm 2,21	0,95 \pm 0,52	1,14	100
Eluato de afinidade	0,06 \pm 0,00	0,70 \pm 0,21	11,17 \pm 3,49	13,3	2,0
Cultura de <i>M. aeruginosa</i>					
Extrato bruto	71,15 \pm 12,62	70,57 \pm 7,69	1,29 \pm 0,34	1	100
Ultra centrifugado	51,49 \pm 4,67	77,89 \pm 16,4	1,27 \pm 0,34	0,98	110
Eluato de afinidade	0,06 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01	13,05 \pm 0,21	10,1	1,2

Os valores representam a média de três réplicas e os respectivos desvios padrão.

Tabela 6 - Processo de purificação das GST's citosólicas do hepatopâncreas de *M. galloprovincialis* expostos a uma cultura de *M. aeruginosa* e MC-LR pura. U*: Unidades = $\mu\text{mol}/\text{min}$

Frações	Proteína Total (mg)	Atividade (U*)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Não-expostos					
Extrato bruto	21,07 \pm 0,94	8,01 \pm 1,78	0,38 \pm 0,08	1	100
Ultracentrifugado	15,71 \pm 0,36	8,24 \pm 2,14	0,52 \pm 0,13	1,38	103
Eluato de afinidade	0,07 \pm 0,00	0,27 \pm 0,20	3,95 \pm 2,76	10,1	3,4
MC-LR Purificada					
Extrato bruto	23,73 \pm 3,50	13,26 \pm 3,57	0,55 \pm 0,07	1	100
Ultracentrifugado	13,64 \pm 2,09	8,86 \pm 1,95	0,65 \pm 0,05	1,17	67
Eluato de afinidade	0,06 \pm 0,00	0,53 \pm 0,53	8,44 \pm 8,65	15,3	2,7
Cultura de <i>M. aeruginosa</i>					
Extrato bruto	24,05 \pm 0,71	11,01 \pm 0,45	0,46 \pm 0,01	1	100
Ultracentrifugado	13,44 \pm 1,33	7,86 \pm 1,08	0,58 \pm 0,02	1,27	71
Eluato de afinidade	0,06 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02	2,89 \pm 0,04	6,4	1,2

Os valores representam a média de três réplicas e os respectivos desvios padrão.

De uma maneira geral, as primeiras duas fases relativas ao processo de homogeneização e centrifugação apresentam elevado conteúdo em proteínas em relação à última etapa de purificação. O rendimento do processo variou entre 1,2 e 2,0 % nas brânquias e 1,2 e 3,4% no hepatopâncreas. Estes rendimentos foram bastante inferiores aos descritos por (Vidal *et al.*, 2002), para as brânquias (50%) e massa visceral (44%) de *Corbicula fluminea*, no entanto semelhantes aos encontrados por Yang *et al.* (2003) no

hepatopâncreas de *Atactodea striata* (2,2%). Para ambos os órgãos, a atividade total diminuiu com as várias etapas do processo de purificação, enquanto a atividade específica aumentou. No caso das brânquias esse aumento variou entre 10,1 e 22,1 vezes e 6,4 e 15,3 vezes no caso do hepatopâncreas. Valores semelhantes foram obtidos por Yang *et al.* (2003) depois de purificar as GST's citosólicas do hepatopâncreas do bivalve marinho *Atactodea striata*, encontrando um aumento da atividade específica de 6,1 vezes após a etapa de purificação por afinidade. Já em *C. fluminea*, os valores encontrados foram bastante superiores após a mesma etapa de purificação, nomeadamente um aumento da atividade específica de 75 vezes na massa visceral e de 120 vezes nas brânquias (Vidal *et al.*, 2002).

4.2 Caracterização das GST's citosólicas por SDS-PAGE e Electroforese Bidimensional

Os perfis proteicos das frações purificadas relativas às brânquias e hepatopâncreas do grupo de bivalves não expostos foram analisados por eletroforese SDS-PAGE (Figura 4). As GST's solúveis são, regra geral, dímeros biologicamente ativos de subunidades compreendidas entre 23 a 30 KDa (Frova, 2006). Foi possível observar nas nossas amostras que o peso molecular das GST's citosólicas de ambos os órgãos se encontram neste intervalo (Figura 4). De facto, o perfil das frações purificadas de ambos os órgãos é semelhante, consistindo em quatro bandas. No entanto, estas parecem demonstrar diferentes intensidades entre elas e entre os órgãos. De referir que estas frações não apresentam contaminação, refletida pela ausência de outras bandas de proteínas com massas moleculares distintas, confirmando o grau de pureza das frações purificadas das brânquias e hepatopâncreas.

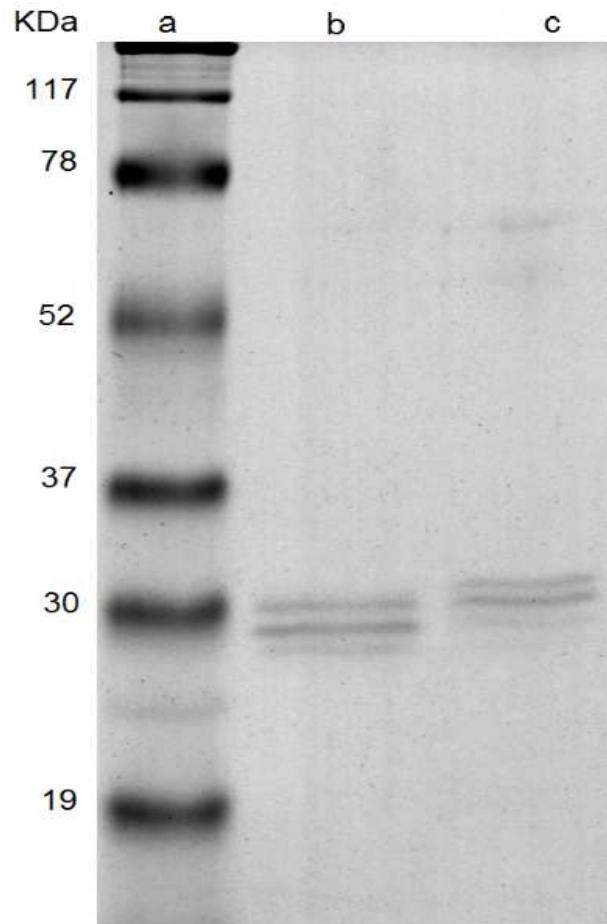


Figura 4 - SDS-PAGE das frações purificadas das brânquias e hepatopâncreas. a: marcador de peso molecular; b: brânquias; c: hepatopâncreas

Os mesmos extratos proteicos purificados relativos às brânquias e ao hepatopâncreas do grupo de bivalves não-expostos foram seguidamente analisados por eletroforese bi-dimensional em tiras IPG de 7cm (pH 5-8) (Figura 5). Com base na análise proteômica foi possível detetar várias potenciais GST`s citosólicas em ambos os órgãos de *M. galloprovincialis*. Usando como corante Azul de Coomassie foram detetados nas brânquias 9 pontos e no hepatopâncreas 10 pontos. Estes pontos foram depois excisados e analisados por MALDI-TOF-MS/MS. Os resultados da identificação revelaram, no entanto, uma discrepância significativa entre o número de pontos visualizado nos géis e os identificados (Tabela 7).

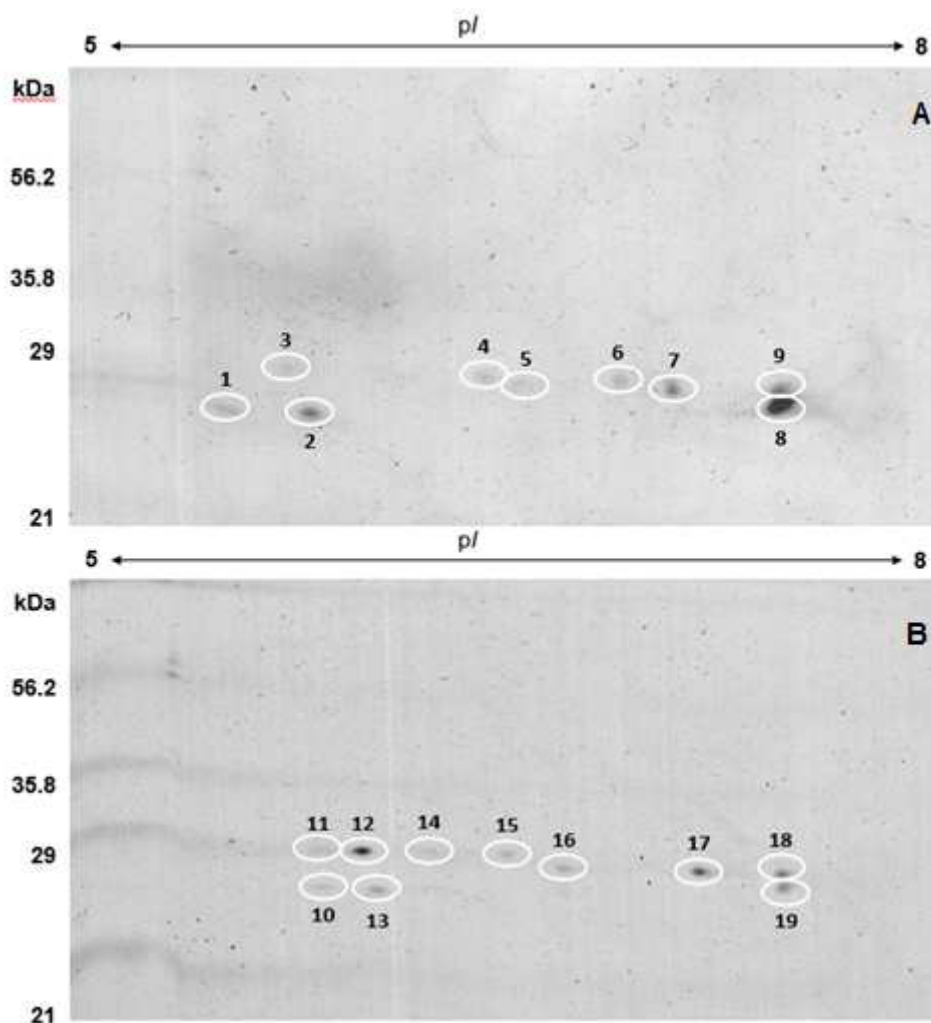


Figura 5 - Perfil de expressão proteica em gel de eletroforese bidimensional (2-DE) obtido a partir de GST's citosólicas purificadas de Brânquias (A) e Hepatopâncreas (B) de *M. galloprovincialis*.

Tabela 7 - Identificação das proteínas purificadas por cromatografia de afinidade das brânquias e hepatopâncreas de *M. galloprovincialis* não expostos.

Pontos	PI/MR Teórico (10 ³)	Identificação Putativa	CI (%)	Homologia da proteína	Atividade Molecular
2	5,4/22,9	GST	100	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Transferase

Dos 19 pontos detetados nas brânquias e hepatopâncreas apenas uma proteína foi identificada com um grau de confiança superior a 95%, após análise dos espectros de massa e pesquisa nas bases de dados por sequências homólogas. Essa proteína corresponde ao ponto 2 nas brânquias e foi identificado como uma putativa subunidade de GST (Tabela 7). São várias as razões que podem explicar a escassez de identificações. O uso de organismos “não-modelo”, como é o caso do molusco *M. galloprovincialis*, pode

levar a uma identificação limitada das proteínas devido à falta de informação nas bases de dados (NCBI, Uniprot) disponíveis (Monsinjon & Knigge, 2007). No entanto, para este bivalve e no que respeita especificamente às GST's citosólicas existe alguma informação disponível. Apesar de não caracterizadas, GST's das classes-*alpha* (1 isoforma), *pi* (1 isoforma) e *sigma* (3 isoformas) estão descritas no GenBank. Aliás, num estudo recente, a análise proteómica de GST's purificadas por cromatografia de afinidade em coluna GSH-agarose do peso total de *M. galloprovincialis* resultaram na identificação de várias subunidades de classe-*pi*_1 e classe-*sigma*_3 com peso molecular aparente entre 27,6 e 30,9 kDa (Martins *et al.*, 2014). Deste modo, a não identificação de outras subunidades GST neste estudo poderá resultar de outras limitações, nomeadamente da baixa abundância de proteínas ou contaminação das amostras por manipulação durante a digestão ou presentes na própria malha de poliacrilamida (2DE).

Apesar da carência de identificações, o único ponto identificado é um bom indicador de que os restantes pontos, apesar de não identificados, sejam também GST's. Trabalhos anteriores sugerem que a maioria de GST's expressas em moluscos bivalves pertence às classes *sigma*, *alpha*, *mu* e *pi*, esta última normalmente a mais expressa (Hoarau *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). Em Martins *et al.* (2014) foram detetadas GST's das classes *pi* e *sigma* em *M. galloprovincialis* com peso molecular compreendido entre 27,6 e 30,9 KDa. Este facto reforça a ideia de que, apesar de não identificados, os pontos obtidos neste estudo possam ser GST's.

4.3 Efeitos da exposição às MCs

4.3.1 Atividade das GST's citosólicas

Na Figura 6 estão representados os valores para a atividade das GST's citosólicas (fração citosólica – Ultracentrifugada) nas brânquias e hepatopâncreas de *M. galloprovincialis* expostos a MC-LR pura e a uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa* produtora essencialmente de MC-LR.

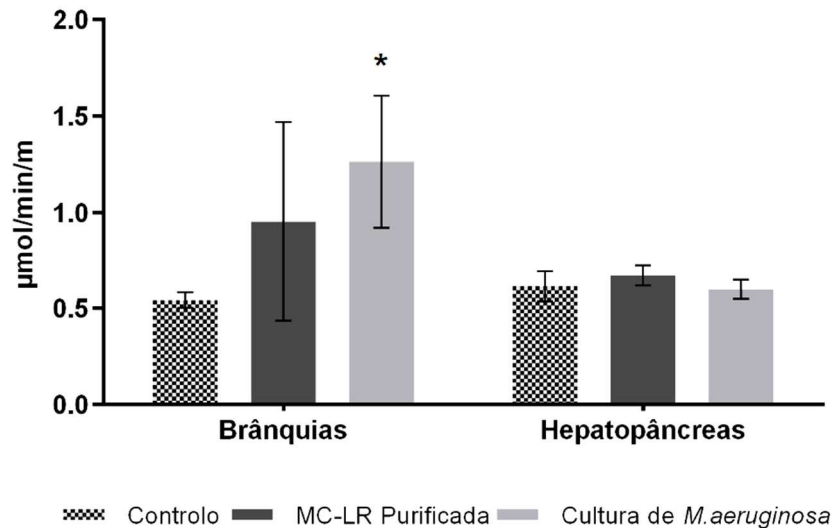


Figura 6 - Actividade das GST's (fração Ultracentrifugada) nas brânquias e trato digestivo de *M. galloprovincialis* expostos a MC-LR pura e a células tóxicas de *M. aeruginosa*. As colunas representam a média de três réplicas. As barras representam o desvio-padrão. As diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente ao grupo de controlo estão assinaladas (*).

Os dois tipos de exposição induziram um aumento da atividade das GST's citosólicas nas brânquias, sendo este significativo na exposição à estirpe tóxica ($p < 0,05$). Neste órgão, comparativamente ao grupo controlo, os organismos expostos a MC-LR purificada mostraram um aumento da atividade das GST's citosólicas de 1,8 vezes e de 2,4 vezes quando expostos à cultura de *M. aeruginosa*. Em contraste, não se verificaram alterações significativas no hepatopâncreas decorrentes dos dois cenários de exposição. No hepatopâncreas, com o tratamento de MC-LR purificada, os organismos apresentaram um ligeiro aumento da atividade das GST's citosólicas de 1,3 vezes relativamente ao controlo e de 1,1 vezes no caso do grupo exposto à cultura de *M. aeruginosa*.

O facto de as brânquias estarem primeiramente expostas à toxina em relação ao hepatopâncreas pode fazer com que estas apresentem alterações mais significativas e precoces das atividades das GST's. Fernandes *et al.* (2009) sugerem que a menor indução de atividade GST no hepatopâncreas em relação às brânquias por uma cultura tóxica de *M. aeruginosa* em mexilhões pode também estar relacionado com a produção de tóxicos intermediários no hepatopâncreas. Estes, durante o metabolismo, podem inativar as enzimas levando à redução dos níveis de atividade das GST's neste órgão. Isto foi previamente observado por Cheung *et al.* (2001) em estudos realizados com *Perna viridis*.

Num estudo similar ao presente, Vasconcelos *et al.* (2007) também observaram aumentos da atividade das GST's nas brânquias de mexilhões quando expostos a MCs puras. No entanto observaram esse mesmo aumento de atividade promovido por MCs puras no hepatopâncreas. Contrariamente a este estudo, os mesmos autores também não observaram qualquer alteração da actividade das GST's induzida por uma cultura tóxica de *M. aeruginosa* (Vasconcelos *et al.*, 2007). As diferenças de resultados entre os dois estudos podem dever-se ao uso de uma mistura de MCs puras (-LR+-YR) e a uma estirpe diferente de *M. aeruginosa* (M13) (Vasconcelos *et al.*, 2007).

4.3.2 Expressão diferencial das GST's citosólicas

As diferenças de expressão proteica quantitativas e qualitativas foram analisadas nas brânquias e hepatopâncreas do mexilhão *M. galloprovincialis* após serem submetidos 24 horas a MC-LR pura e a uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa*. Na análise quantitativa só foram considerados os pontos com um factor mínimo de variação de abundância de 5 vezes dos grupos de exposição em relação ao grupo controlo. Para a análise quantitativa foi considerada a presença/ausência dos pontos dos grupos de exposição em relação ao grupo controlo.

Nas brânquias, a alteração quantitativa da expressão de proteínas foi detetada em 5 pontos no grupo de bivalves expostos à cultura de *M. aeruginosa*. Todos os pontos foram sobre-expressos em relação ao grupo controlo, com diferenças de expressão entre 5,8 e 15,7 vezes. Entre estes está o ponto 2, identificado como uma putativa subunidade GST, com uma diferença de expressão em relação ao controlo de 11,9 vezes. Neste órgão foram detetadas 2 diferenças qualitativas entre os grupos de exposição e o grupo controlo em ambos os grupos de exposição. Os pontos 3 e 5 estão ausentes nos bivalves expostos a MC-LR e à cultura de *M. aeruginosa*.

No hepatopâncreas, a alteração quantitativa da expressão de proteínas foi detetada em 4 pontos no grupo de bivalves expostos a MC-LR pura e em 1 ponto no grupo de bivalves expostos a *M. aeruginosa*. Todos os pontos foram sobre-expressos nos bivalves expostos a MC-LR em relação ao grupo controlo, com diferenças de expressão entre 6,1 e 9,2 vezes. Relativamente aos bivalves expostos a *M. aeruginosa*, o único ponto quantitativamente alterado foi sub-expresso em relação ao controlo, com uma diferença de expressão de 6,2 vezes.

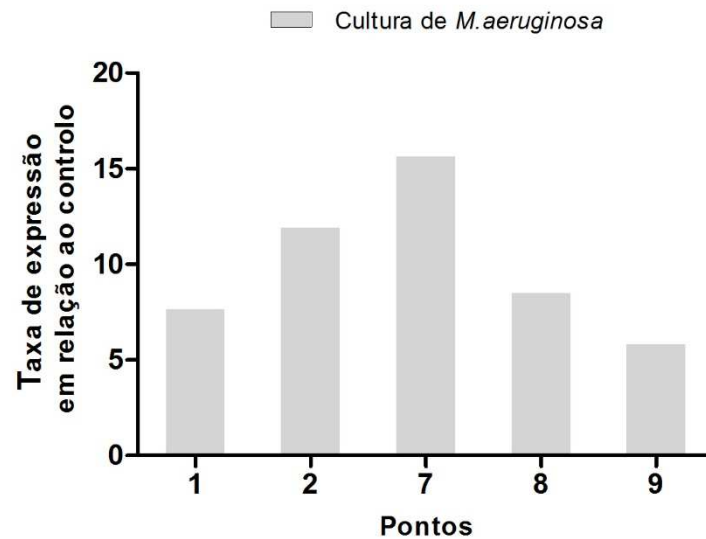


Figura 7 - Proteínas diferencialmente expressas nas brânquias em relação ao grupo controle.

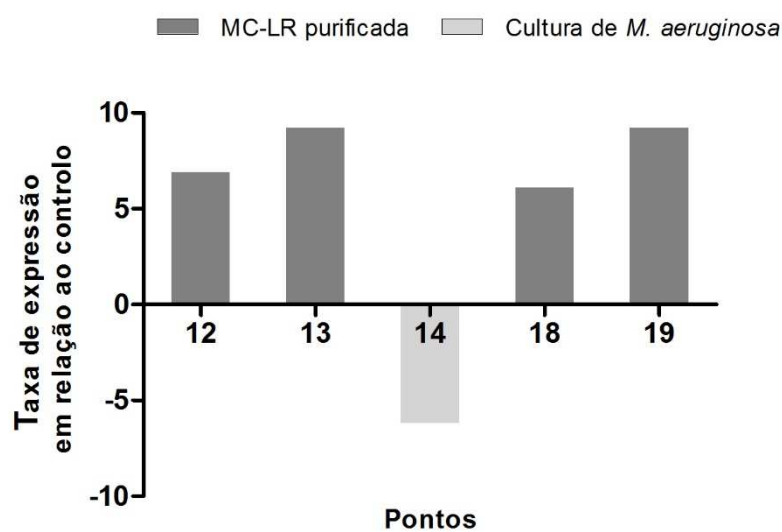


Figura 8 - Proteínas diferencialmente expressas no hepatopâncreas em relação ao grupo controle.

As alterações quantitativas e qualitativas da expressão de proteínas suportam os dados obtidos para a atividade das GST's citosólicas em ambos os órgãos. Nas brânquias, ao aumento significativo da actividade das GST's (Ultracentrifugado) após exposição dos bivalves à cultura de *M. aeruginosa* corresponde uma sobre-expressão de 5 proteínas em relação ao controle com diferenças até 15,7 vezes. Ainda neste órgão, o aumento de atividade promovido por ambas as exposições reflete-se na ausência dos mesmos dois

pontos nos géis 2DE relativos ao grupo de bivalves expostos a MC-LR e *M. aeruginosa*. No hepatopâncreas, o ligeiro aumento de actividade (Ultracentrifugado) nos organismos expostos a MC-LR reflete-se na sobre-expressão de 4 proteínas em relação ao controlo com diferenças até 9,2 vezes. Na exposição à cultura de *M. aeruginosa*, a sub-expressão de uma proteína em relação ao controlo reflete a ligeira diminuição da actividade obtida para o eluato de afinidade.

5. Conclusões e Perspetivas futuras

A análise proteómica revelou-se como uma ferramenta válida na deteção e avaliação da alteração da expressão de potenciais GST's citosólicas nas brânquias e hepatopâncreas de *M. galloprovincialis* sujeitos a MC-LR pura e a uma cultura tóxica de *M. aeruginosa*.

A análise bidimensional das frações purificadas por cromatografia de afinidade permitiu a deteção de vários pontos em ambos os órgãos. No entanto foi apenas possível identificar um ponto com confiança estatística, correspondendo a uma subunidade GST nas brânquias.

A exposição a *M. aeruginosa* induziu a sobre-expressão de várias proteínas nas brânquias e a sub-expressão de uma proteína no hepatopâncreas. Por sua vez, a exposição a MC-LR induziu apenas a sobre-expressão de várias proteínas no hepatopâncreas. Nas brânquias, ambas as exposições promoveram a ausência dos mesmos dois pontos.

As alterações quantitativas e qualitativas da expressão de proteínas suportam os dados obtidos para a atividade das GST's citosólicas em ambos os órgãos.

Este trabalho constitui uma primeira abordagem ao papel individual de cada uma das isoformas das várias classes de GST's na destoxificação das MCs. De modo a melhorar a qualidade dos resultados deverá ser realizada uma repetição da identificação dos pontos detetados por MALDI-TOF-MS/MS. Os resultados obtidos podem ajudar a compreender melhor os mecanismos subjacentes à destoxificação de MCs em bivalves, organismos amplamente utilizados em todo o mundo como indicadores na monitorização ambiental.

6. Referências

- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., ... Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *The Science of the Total Environment*, 407(6), 2115–2123.
- Amado, L. L., & Monserrat, J. M. (2010). Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environment International*, 36(2), 226–235.
- Amorim, a, & Vasconcelos, V. (1999). Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 37(7), 1041–1052.
- Amorim, L. C. A. (2003). O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. *Rev. Bras. Med. Trab.*, 1(2), 124–132.
- Apraiz, I., Mi, J., & Cristobal, S. (2006). Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 5, 1274–1285.
- Bebianno, M. J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., & Ferreira, A. M. (2007). Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. *Environment International*, 33(4), 550–558.
- Bittencourt-Oliveira, M. C., Piccin-santos, V., & Gouvêa-Barros, S. (2010). Microcystin-Producing Genotypes from Cyanobacteria in Brazilian Reservoirs. *Environmental Toxicology*, 27, 461–471.
- Blanchette, B., Feng, X., & Singh, B. R. (2007). Marine glutathione S-transferases. *Marine Biotechnology*, 9(5), 513–542.
- Botes, D. P., Wessels, P. L., Kruger, H., Runnegar, M. T. C., Santikarn, S., Smith, R. J., ... Williams, D. H. (1985). Structural Studies on Cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, Peptide Toxins from Structural Studies on Cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, Peptide Toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, (2), 2747–2748.
- Bradley, B. P., Shrader, E. A., Kimmel, D. G., & Meiller, J. C. (2002). Protein expression signatures: An application of proteomics. In *Marine Environmental Research* (Vol. 54, pp. 373–377).
- Branch, G. M., & Nina Steffani, C. (2004). Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300(1-2), 189–215.

- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. In *Science of the Total Environment* (Vol. 247, pp. 295–311).
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. *The Journal of Applied Bacteriology*, 72, 445–459.
- Carmichael, W. W. (2001). Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs." *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 7(5), 1393–1407.
- Chen, J., & Xie, P. (2005). Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environmental Toxicology*, 20(6), 572–584.
- Chen, T., Wang, Q., Cui, J., Yang, W., Shi, Q., Hua, Z., ... Shen, P. (2005). Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(7), 958–74.
- Cheung, C. C. C., Zheng, G. J., Li, A. M. Y., Richardson, B. J., & Lam, P. K. S. (2001). Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, 52, 189–203.
- Chorus, I., & Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water : A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon.
- Clark, G. A. (1989). The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from nonvertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 3, 419–446.
- Codd, G. a, Ward, C. J., & Bell, S. G. (1997). Cyanobacterial toxins: occurrence, modes of action, health effects and exposure routes. *Archives of Toxicology. Supplement. = Archiv Für Toxikologie. Supplement*, 19, 399–410.
- Craig, M., Luu, H. A., McCready, T. L., Williams, D., Andersen, R. J., & Holmes, C. F. (1996). Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochemistry and Cell Biology*, 74, 569–578.
- Dawson, R. M. (1997). Review article the toxicology of microcystins, 36(7), 953–962.
- Ding, W.-X., & Nam Ong, C. (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiology Letters*, 220(1), 1–7.
- Dowling, V. a, & Sheehan, D. (2006). Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics*, 6(20), 5597–604.
- Fernandes, S., Welker, M., & Vasconcelos, V. M. (2009). Changes in the GST activity of the mussel *Mytilus galloprovincialis* during exposure and depuration of microcystins.

- Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 311(3), 226–30.
- Ferrão-Filho, A. da S. (2009). Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. *Oecologia Australis*.
- Feurstein, D., Holst, K., Fischer, A., & Dietrich, D. R. (2009). Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), 247–255.
- Fischer, W. J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P. J., Dietrich, D. R., & Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3), 257–263.
- Fitzpatrick, P. J., Krag, B., Hojrupt, P., & Sheehan, D. (1995). Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Biochem. J.*, 305, 145–150.
- Fitzpatrick, P. J., & Sheehan, D. (1993). Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 23, 851–861.
- Frova, C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomolecular Engineering*, 23(4), 149–69.
- Fu, J., & Xie, P. (2006). The acute effects of microcystin LR on the transcription of nine glutathione S-transferase genes in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 80(3), 261–266.
- Goldberg, E. D., & Bertine, K. K. (2000). Beyond the Mussel Watch--new directions for monitoring marine pollution. *The Science of the Total Environment*, 247, 165–174.
- Gosling, E. (1992). *The mussel Mytilus: ecology, physiology genetics and culture. The mussel Mytilus: ecology, physiology genetics and culture*. Elsevier.
- Gosling, E. (2003). *Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture*. Oxford: Fishing News Books (Blackwell Publishing).
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine. Free Radical Biology and Medicine* (pp. 449–450).
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88.
- Heinemeyer, J., Lewejohann, D., & Braun, H.-P. (2007). Blue-native gel electrophoresis for the characterization of protein complexes in plants. *Methods in Molecular Biology*, 355, 343–352.
- Hilbish, T. J., Mullinax, A., Dolven, S. I., Meyer, A., Koenh, R. K., & Rawson, P. D. (2000). Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp .): routes and timing of transequatorial migration. *Marine Biology*, 136, 69–77.

- Hitzfeld, B. C., Höger, S. J., & Dietrich, D. R. (2000). Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 108, 113–122.
- Hoarau, P., Damiens, G., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., & Bebianno, M. J. (2006). Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 143(2), 196–203.
- Hoarau, P., Garelo, G., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., & Girard, J.-P. (2002). Purification and partial characterization of seven glutathione S-transferase isoforms from the clam *Ruditapes decussatus*. *European Journal of Biochemistry*, 269(17), 4359–4366.
- Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., & Girard, J.-P. (2001). Differential induction of Glutathione S-Transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3), 523–529.
- Honkanen, R. E., Zwiller, J., Moore, R. E., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M., & Boynton, A. L. (1990). Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 19401–19404.
- Huber, P. C., Almeida, W. P., & De Fátima, Â. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*.
- Ibelings, B. W., & Chorus, I. (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environmental Pollution*, 150(1), 177–192.
- Ito, E., Takai, A., Kondo, F., Masui, H., Imanishi, S., & Harada, K. I. (2002). Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon*, 40, 1017–1025.
- Kankaanpää, H., Leiniö, S., Olin, M., Sjövall, O., Meriluoto, J., & Lehtonen, K. K. (2007). Accumulation and depuration of cyanobacterial toxin nodularin and biomarker responses in the mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere*, 68(7), 1210–7.
- Khessiba, P., Hoarau, M., Gnassia-Bar, a. (2001). Biochemical Response of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to Chemical Pollutant Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(2), 222–229.
- Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Ishikawa, N., Ito, E., Nagata, S., ... Harada, K. (1996). Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chemical Research in Toxicology*, 9, 1355–1359.
- Lance, E., Briant, L., Carpentier, A., Acou, A., Marion, L., Bormans, M., & Gérard, C. (2010). Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a

- eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to *Physa* (= *Physella*) *acuta*. *The Science of the Total Environment*, 408(17), 3560–3568.
- Lee, S. Y., & Morton, B. (1985). The introduction of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* into Hong Kong. *Malacological Review*, 18, 107–109.
- Li, G., Xie, P., Fu, J., Hao, L., Xiong, Q., & Li, H. (2008). Microcystin-induced variations in transcription of GSTs in an omnivorous freshwater fish, goldfish. *Aquatic Toxicology*, 88(1), 75–80.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., & Liu, J. (2003). Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon*, 42(1), 85–89.
- López-Barea, J., & Gómez-Ariza, J. L. (2006). Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics*, 6, S51–S62.
- Mannervik, B., & Jemth, P. (2001). Measurement of glutathione transferases. *Current Protocols in Toxicology*.
- Martins, J. C., Campos, A., Osório, H., da Fonseca, R., & Vasconcelos, V. (2014). Proteomic Profiling of Cytosolic Glutathione Transferases from Three Bivalve Species: *Corbicula fluminea*, *Mytilus galloprovincialis* and *Anodonta cygnea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 1887–1900.
- Martins, J. C., Leão, P. N., & Vasconcelos, V. (2009). Differential protein expression in *Corbicula fluminea* upon exposure to a *Microcystis aeruginosa* toxic strain. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 53(4), 409–416.
- Martins, J. C., & Vasconcelos, V. M. (2009). Microcystin dynamics in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 12(1), 65–82.
- Martins, J., Saker, M. L., Moreira, C., Welker, M., Fastner, J., & Vasconcelos, V. M. (2009). Peptide diversity in strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Portuguese water supplies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 951–961.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711–760.
- Mezhoud, K., Praseuth, D., Puiseux-Dao, S., François, J.-C., Bernard, C., & Edery, M. (2008). Global quantitative analysis of protein expression and phosphorylation status in the liver of the medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to microcystin-LR I. Balneation study. *Aquatic Toxicology*, 86(2), 166–75.
- Miller, M. a, Kudela, R. M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S. C., Tinker, M. T., ... Jessup, D. a. (2010). Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PloS One*, 5(9).
- Monsinjon, T., & Knigge, T. (2007). Proteomic applications in ecotoxicology. *Proteomics*.

- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9, 255–262.
- Papadimitriou, T., Kagalou, I., Stalikas, C., Pilidis, G., & Leonardos, I. D. (2012). Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. *Ecotoxicology*, 21(4), 1155–1166.
- Patrick J Fitzpatrick John O'Halloran David Sheehan And Andrew R Walsh. (1997). Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2, 51–56.
- Pérez-López, M., Nóvoa-Valiñas, M. C., & Melgar-Riol, M. J. (2002). Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. *Toxicology Letters*, 136, 97–106.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., & Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 3551–3567. doi:10.1002/(SICI)1522-2730(199909)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K. a, Krause, E., Steinberg, C. E., & Codd, G. a. (2001). Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) trin. ex steud. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(4), 846–852.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K. A., Krause, E., Codd, A., & Steinberg, C. E. W. (1998). Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425, 527–533.
- Poste, A. E., Hecky, R. E., & Guildford, S. J. (2011). Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. *Environmental Science & Technology*, 45(13), 5806–5811.
- Prepas, E. E., Kotak, B. G., Campbell, L. M., Evans, J. C., Hruday, S. E., & Holmes, C. F. B. (1997). Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54, 41–46.
- Prieto, A. I., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I., & Cameán, A. M. (2006). Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquatic Toxicology*, 77(3), 314–321.
- Prieto, A. I., Pichardo, S., Jos, A., Moreno, I., & Cameán, A. M. (2007). Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells

- containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 84(3), 337–345.
- Puerto, M., Campos, A., Prieto, A., Cameán, A., de Almeida, A. M., Coelho, A. V., & Vasconcelos, V. (2011). Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 101(1), 109–116.
- Ramanan, S., Tang, J., & Velayudhan, A. (2000). Isolation and preparative purification of microcystin variants. *Journal of Chromatography. A*, 883(1-2), 103–112.
- Robinson, N. A., Pace, J. G., Matson, C. F., Miura, G. A., & Lawrence, W. B. (1991). Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256, 176–182.
- Saker, M. L., Fastner, J., Dittmann, E., Christiansen, G., & Vasconcelos, V. M. (2005). Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 749–757.
- Shepard, J. L., & Bradley, B. P. (2000). Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. In *Marine Environmental Research* (Vol. 50, pp. 457–463).
- Shepard, J. L., Olsson, B., Tedengren, M., & Bradley, B. P. (2000). Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. In *Marine Environmental Research* (Vol. 50, pp. 337–340).
- Vararattanavech, A., & Ketterman, A. J. (2007). A functionally conserved basic residue in glutathione transferases interacts with the glycine moiety of glutathione and is pivotal for enzyme catalysis. *The Biochemical Journal*, 406(2), 247–256.
- Vasconcelos, V. M. (1995). Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*, 32, 227–237.
- Vasconcelos, V. M. (1999). Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(3), 249–254.
- Vasconcelos, V. M. de O. e. (1995). *Toxicologia de cianobactérias. Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves*. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- Vasconcelos, V. M., Wiegand, C., & Pflugmacher, S. (2007). Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 50(6), 740–745.
- Vidal, M. L., Rouimi, P., Debrauwer, L., & Narbonne, J. F. (2002). Purification and characterisation of glutathione S-transferases from the freshwater clam *Corbicula*

- fluminea (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 131, 477–489.
- Wetmore, B., & Merrick, B. (2004). Toxicoproteomics: Proteomics Applied to Toxicology and Pathology. *Toxicologic Pathology*, 32(6), 619–642.
- WHO. (2003). Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 2.
- Wiegand, C., Peuthert, A., Pflugmacher, S., & Carmeli, S. (2002). Effects of microcin SF608 and microcystin-LR two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. *Environmental Toxicology*, 17, 400–406.
- Wiegand, C., & Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3), 201–218.
- Xu, C., Pan, L., Liu, N., Wang, L., & Miao, J. (2010). Cloning, characterization and tissue distribution of a pi-class glutathione S-transferase from clam (*Venerupis philippinarum*): Response to benzo[α]pyrene exposure. *Comp Biochem Phys*, 152(2), 160–166.
- Yang, H. L., Nie, L. J., Zhu, S. G., & Zhou, X. W. (2002). Purification and characterization of a novel glutathione S-transferase from *Asaphis dichotoma*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 403, 202–208.
- Yang, H. L., Zeng, Q. Y., Nie, L. J., Zhu, S. G., & Zhou, X. W. (2003). Purification and characterization of a novel glutathione S-transferase from *Atactodea striata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 626–631.
- Zegura, B., Zajc, I., Lah, T. T., & Filipic, M. (2008). Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicon*, 51(4), 615–623.

7. Anexos

7.1 Quantificação de MC-LR purificada por HPLC-PDA

7.1.1 Reta de Calibração

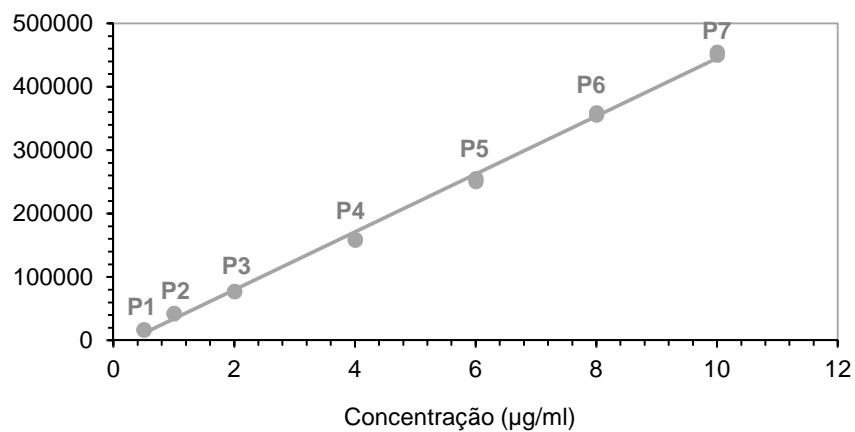


Figura 9 - Gráfico da reta de calibração com os valores dos padrões 1 a 7

A equação da reta de calibração do gráfico da Figura 9, usada para o cálculo da MC-LR foi: $y = 45644 x - 11514$.

7.1.2 Cromatogramas do Sistema de HPLC

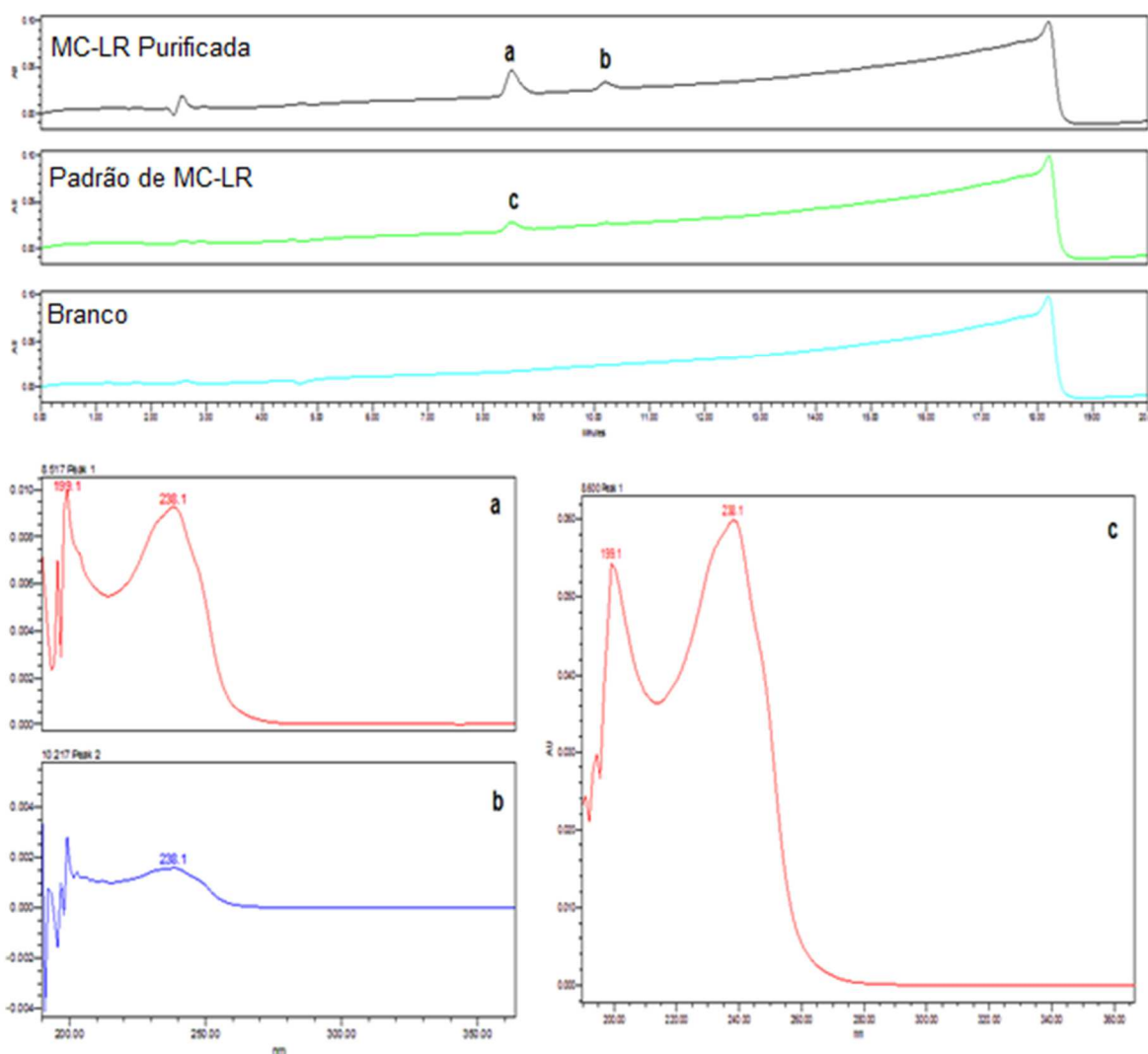


Figura 10 - Cromatogramas do sistema de HPLC referente a MC-LR Purificada, Extrato Bruto de *M. aeruginosa*, Padrão e Branco e os seus respectivos espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm.

O valor obtido da concentração de MC-LR purificada foi de 9,2 µg/mL e o grau de pureza 90,31%.



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto PTDC/MAR-EST/4614/2012 - “The role of glutathione-S-transferase isoenzymes in bivalve’s tolerance to microcystins”.